

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

27.09.00

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

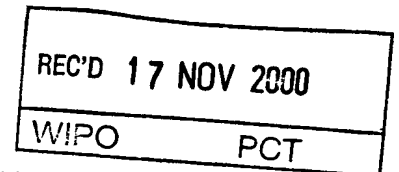
1999年 8月30日

出願番号  
Application Number:

平成11年特許願第242672号

出願人  
Applicant(s):

日本たばこ産業株式会社



JP00/05868

E KU

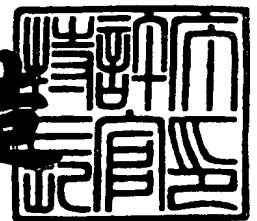
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年11月 6日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3089845

【書類名】 特許願

【整理番号】 J99-0265

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 39/395

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区福浦 1 - 1 3 - 2 日本たばこ産業株式会社 医薬探索研究所内

【氏名】 手塚 克成

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区福浦 1 - 1 3 - 2 日本たばこ産業株式会社 医薬探索研究所内

【氏名】 渡部 良広

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県流山市東深井 8 6 9 - 1 7

【氏名】 安部 良

【特許出願人】

【識別番号】 000004569

【氏名又は名称】 日本たばこ産業株式会社

【代表者】 水野 勝

【代理人】

【識別番号】 100100217

【弁理士】

【氏名又は名称】 大東 輝雄

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 058632

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

特平 1 1 - 2 4 2 6 7 2

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9803681

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 免疫性疾患治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 AILIMに結合しAILIM発現細胞の増殖を抑制するか、またはAILIMに結合しAILIM発現細胞によるサイトカインの産生を抑制する活性を有する物質並びに薬学的に許容され得る担体を含んでなる関節症を抑制または治療するための医薬組成物。

【請求項 2】 該サイトカインが、Th1タイプのT細胞が産生するサイトカインであるインターフェロン $\gamma$ であるか、またはTh2タイプのT細胞が産生するサイトカインであるインターロイキン4であることを特徴とする請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】 該関節症が関節リウマチであることを特徴とする請求項 1 または請求項 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】 該関節症が変形性関節症であることを特徴とする請求項 1 または請求項 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】 該物質が蛋白性物質であることを特徴とする請求項 1 乃至請求項 4 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 6】 該蛋白性物質がポリペプチド、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体または該モノクローナル抗体の一部であることを特徴とする請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】 該物質が非蛋白性物質であることを特徴とする請求項 1 乃至請求項 4 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 8】 該非蛋白性物質がDNA、RNAまたは化学的に合成された化合物であることを特徴とする請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】 AILIMに結合しAILIM発現細胞の増殖を抑制するか、またはAILIMに結合しAILIM発現細胞によるサイトカインの産生を抑制する活性を有する物質並びに薬学的に許容され得る担体を含んでなる炎症を抑制または治療するための医薬組成物。

【請求項 10】 該サイトカインが、Th1タイプのT細胞が産生するサイト

カインであるインターフェロン $\gamma$ であるか、またはTh2タイプのT細胞が産生するサイトカインであるインターロイキン4であることを特徴とする請求項9に記載の医薬組成物。

【請求項11】 該炎症が肝炎であることを特徴とする請求項9または請求項10に記載の医薬組成物。

【請求項12】 該物質が蛋白性物質であることを特徴とする請求項9乃至請求項11のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項13】 該蛋白性物質がポリペプチド、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体または該モノクローナル抗体の一部であることを特徴とする請求項12に記載の医薬組成物。

【請求項14】 該物質が非蛋白性物質であることを特徴とする請求項9乃至請求項11のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項15】 該非蛋白性物質がDNA、RNAまたは化学的に合成された化合物であることを特徴とする請求項14に記載の医薬組成物。

【請求項16】 AILIMに結合しAILIM発現細胞の増殖を抑制するか、またはAILIMに結合しAILIM発現細胞によるサイトカインの産生を抑制する活性を有する物質並びに薬学的に許容され得る担体を含んでなる移植片対宿主反応を抑制または移植片対宿主病を治療するための医薬組成物。

【請求項17】 該サイトカインが、Th1タイプのT細胞が産生するサイトカインであるインターフェロン $\gamma$ であるか、またはTh2タイプのT細胞が産生するサイトカインであるインターロイキン4であることを特徴とする請求項16に記載の医薬組成物。

【請求項18】 該物質が蛋白性物質であることを特徴とする請求項16または請求項17に記載の医薬組成物。

【請求項19】 該蛋白性物質がポリペプチド、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体または該モノクローナル抗体の一部であることを特徴とする請求項18に記載の医薬組成物。

【請求項20】 該物質が非蛋白性物質であることを特徴とする請求項16または請求項17に記載の医薬組成物。

【請求項 21】 該非蛋白性物質が DNA、RNA または化学的に合成された化合物であることを特徴とする請求項 20 に記載の医薬組成物。

【請求項 22】 AILIM に結合し AILIM 発現細胞の増殖を抑制するか、または AILIM に結合し AILIM 発現細胞によるサイトカインの産生を抑制する活性を有する物質並びに薬学的に許容され得る担体を含んでなる外来抗原または自己抗原による免疫感作により惹起される該抗原に対する抗体の産生を抑制するための医薬組成物。

【請求項 23】 該サイトカインが、Th1 タイプの T 細胞が産生するサイトカインであるインターフェロン  $\gamma$  であるか、または Th2 タイプの T 細胞が産生するサイトカインであるインターロイキン 4 であることを特徴とする請求項 22 に記載の医薬組成物。

【請求項 24】 該物質が蛋白性物質であることを特徴とする請求項 22 または請求項 23 に記載の医薬組成物。

【請求項 25】 該蛋白性物質がポリペプチド、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体または該モノクローナル抗体の一部であることを特徴とする請求項 24 に記載の医薬組成物。

【請求項 26】 該物質が非蛋白性物質であることを特徴とする請求項 22 または請求項 23 に記載の医薬組成物。

【請求項 27】 該非蛋白性物質が DNA、RNA または化学的に合成された化合物であることを特徴とする請求項 26 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、AILIM (activation inducible lymphocyte immunomodulatory molecule; 別名を「JTT-1 抗原」、「JTT-2 抗原」、「ICOS (inducible co-stimulator)」または「8F4」という。) に結合し AILIM 発現細胞の増殖を抑制するか、または AILIM に結合し AILIM 発現細胞によるサイトカイン (例えば、インターフェロン  $\gamma$  またはインターロイキン 4 など) の産生を抑制する活性を有する物質を含んでなる医薬組成物に関し、具体的には、関節症 (例えば、関節リウマチ (rheuma



toid arthritis; RA)、変形性関節症 (osteoarthritis; OA)) を抑制または治療するための医薬組成物、炎症 (例えば、肝炎) を抑制または治療するための医薬組成物、移植片対宿主反応 (graft versus host reaction; GVH reaction) を抑制するための医薬組成物、移植片対宿主病 (graft versus host disease; GVHD) を抑制または治療するための医薬組成物、並びに外来抗原若しくは自己抗原による免疫感作により惹起される該抗原に対する抗体の産生を抑制するための医薬組成物に関する。

## 【0002】

## 【従来の技術】

哺乳動物の生体は、体内に侵入した病原微生物 (ウイルス、細菌、寄生虫など) や外来異物など (以下、併せて「抗原」と呼ぶ。) を排除しようとする免疫応答システムを有する。その1つは、自然免疫応答システムと呼ばれ、他の1つは獲得免疫応答システムと呼ばれるものである。前者は、食細胞 (多形核白血球、単球、マクロファージなど) による貪食、ナチュラルキラー (NK) 細胞による攻撃、及び補体による抗原のオプソニン化などのような非特異的な認識による排除機構である。後者の獲得免疫応答システムは、該抗原に対する特異性を獲得 (活性化) したリンパ球 (主にT細胞、B細胞) による排除機構である。

## 【0003】

抗原特異性を獲得したB細胞は、該抗原に特異的な抗体を産生することにより細胞外に存在する該抗原を攻撃する。抗原特異性を獲得 (活性化) したT細胞は、ヘルパーT細胞と細胞傷害性T細胞 (cytotoxic T cell; cytotoxic lymphocyte; CTL) に分類され、前者はB細胞の分化や抗体の産生を調節するとともに食細胞と協同して該抗原を破壊する。後者は、自らウイルス感染細胞などを攻撃する (実験医学 (別冊) ・「Bio Science用語ライブラリー [免疫]」、羊土社、p.14-17、1995)。

## 【0004】

このT細胞による抗原特異性の獲得 (活性化) は、T細胞が、マクロファージ、B細胞あるいは樹状細胞などの抗原提示細胞 (antigen-presenting cells: APC) により提示される抗原を認識することにより開始される。抗原提示細胞は、

取り込んだ抗原をプロセッシング（加工）し、この加工された抗原を主要組織適合性抗原複合体（MHC）に結合させて抗原提示する。T細胞は、抗原提示細胞により提示された該加工抗原を、その細胞膜表面に有するT細胞受容体（TcR）とCD3抗原との複合体（TcR/CD3複合体）を通じて認識することで細胞の活性化（特異性の獲得）のための第1のシグナルを受ける。

【0005】

しかしながら、このTcR/CD3複合体を介した第1シグナルだけでは、T細胞の十分な活性化が起こらないだけでなく、その後を受ける如何なる刺激に対しても反応しなくなる不応答状態（unresponsiveness）またはクローン麻痺（clonal anergy）と呼ばれる状態に陥る。T細胞が活性化され抗原特異的なT細胞クローンに分化、増殖するためにはインターロイキン-2（IL-2）の自己分泌（オートクリン；autocrine）が必要であるが、クローン麻痺の状態ではIL-2などが産生されず細胞分裂が起こらないため、T細胞が不活性化された状態となる。即ち、IL-2などのサイトカインの産生を伴うT細胞の活性化には、TcR/CD3複合体を介した第1シグナルに引き続く第2のシグナルを必要とする。この第2のシグナルはコストイミュレイトリーシグナル（副刺激シグナル；costimulatory signal）と呼ばれる。

【0006】

T細胞は、T細胞表面上のTcR/CD3複合体とは別の分子を介して抗原提示細胞上のMHCとは別の分子と相互作用（細胞間接着）することによりこの第2のシグナルを受けとり細胞内に伝達する。この第2のシグナルにより細胞のアナジー（クローン麻痺）が回避されるとともに細胞が活性化される。

【0007】

抗原提示細胞とT細胞等のリンパ球の間の第2のシグナルの伝達のメカニズムについては未だ詳細に解明されていない部分はあるものの、これまでの研究から、この第2のシグナル伝達には、主にT細胞及び胸腺細胞で発現する細胞表面分子であるCD28（別名：Tp44、T44、又は9.3抗原）と抗原提示細胞（マクロファージ、単球、樹状細胞など）で発現する細胞表面分子であるCD80（別名：B7-1、B7、BB1、またはB7/BB1）及び同じく抗原提示細胞状の細胞表面分子であるCD86（

別名：B7-2またはB70）との間の相互作用（即ち、それらの分子間の結合を介した細胞間接着）が極めて重要であることが明らかにされている。

#### 【 0 0 0 8 】

さらにこの第2のシグナルによるT細胞の活性化の制御には、該第2のシグナルに依存してその発現が増強されると考えられているCTLA-4 (Cytolytic T lymphocyte associated antigen 4) と該CD80(B7-1)及びCD86(B7-2)との間の相互作用（即ち、それらの分子間の結合を介した細胞間接着）も重要な役割を担っていることが実験的に明らかにされてきている。即ち、この第2のシグナルの伝達によるT細胞の活性化の制御には、少なくともCD28とCD80/CD86との間の相互作用、該相互作用に依存すると考えられるCTLA-4の発現の増強、並びにCTLA-4とCD80/CD86との間の相互作用が包含されることが明らかにされてきている。

#### 【 0 0 0 9 】

CD28は、このT細胞の活性化とアナジの回避に必要な第2のシグナル（コスティミュレトリー・シグナル）を伝達するコスティミュレーター分子であることが明らかにされている。この分子が抗原提示細胞上のコスティミュレーター分子であるCD80(B7-1)及びCD86(B7-2)と結合すること（換言すれば、それらの分子間の結合を介した細胞間接着）により伝達される第2のシグナルは、Th1型サイトカインのmRNAを安定化させ、その結果T細胞からのIL-2、IFN $\gamma$ 及びTNF $\alpha$ などのTh1型サイトカインを大量の産生を促す。一方、CTLA-4は、TcR/CD3を通じて入る第1シグナルにより発現が誘導されるとともに、CD28とCD80との結合により入る該第2のシグナルによってもその発現が増強されることが知られている。CTLA-4は、それらのシグナルを受けて、CD28より入る第2のシグナルによるT細胞の活性化とは反対にT細胞機能に対して抑制的に働くことが明らかになってきている。

#### 【 0 0 1 0 】

ヒトのCD28及びCTLA-4は、各々44kD及び41乃至43kDの分子量を有するI型糖蛋白質である。ともに免疫グロブリン様ドメイン1個を有し、免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、細胞間接着分子としての機能と細胞内へのシグナル伝達分子としての両方の機能を併せ持った分子である。

【0011】

ヒトCD28はジスルフィド結合によりホモ二量体を形成し、一方、CTLA-4は単量体で存在することが示されている。CD28及びCTLA-4の遺伝子の染色体上に位置は、ヒトにおいてはいずれも「2q33」、またマウスにおいては「1C」であり、いずれも4つのエクソンからなる。ヒトのCD28及びCTLA-4は、リーダー配列を含め各々220及び223個のアミノ酸から構成され、両者のアミノ酸相同性は20乃至30%程度である。

【0012】

CD28及びCTLA-4のリガンドは、ヒト及びマウスにおいてCD80 (B7-1) 及びCD86 (B7-2) であることが解明されている。CTLA-4は、いずれのリガンドに対してもCD28より親和性が高く、その差は約20倍である。CD28及びCTLA-4のCD80 (B7-1) への結合には、動物種を超えて保存されているアミノ酸配列構造である「MYPPPY (Met-Tyr-Pro-Pro-Pro-Tyr)」が重要であることが明らかにされている。また、CD28が刺激を受けると、その細胞内の部分配列「YMN (Tyr-Met-Asn-Met)」内のリン酸化されたチロシン残基へPI3キナーゼ (phosphoinositide 3 kinase, PI3K) が会合することが示され、CD28はこの「YxxM」構造を介して細胞内シグナル伝達において重要な働きをしていることが示されてきている。また、CTLA-4の細胞内領域にも「YxxM」で表わされる配列、即ち「YVKM (Tyr-Val-Lys-Met)」を有しており、刺激を受けた後、この配列にSYNが会合することが示されている。

【0013】

CD28は、胸腺細胞及び末梢血T細胞に局限して発現し、一方CTLA-4は活性化T細胞に特異的に発現することがわかってきている(細胞工学・別冊「接着分子ハンドブック」、秀潤社発行、第93-102頁、1994年；同誌、第120-136頁；実験医学・別冊「BIO SCIENCE 用語ライブラリー・免疫」、羊土社発行、第94-98頁、1995年；実験医学・別冊「BIO SCIENCE 用語ライブラリー・細胞内シグナル伝達」、羊土社発行、第58-59頁、1997年；日本臨床、第55巻、第6号、第215-220頁、1997年)。

【0014】

このようにしてT細胞機能の制御（T細胞の活性化及び機能抑制）におけるコストイミュレーター分子（CD28、CD80（B7-1）及びCD86（B7-2）など）並びに運動するCTLA-4などの複数の分子の間の相互作用（換言すれば、それらの分子間の結合を介した細胞間接着）の重要性が提唱されるようになり、それらの分子と疾患との関係の解明、並びにそれらの分子の機能を制御することによる疾患の治療の試みが注目されるようになってきている。

## 【0015】

前述のように、生体は、生体（自己）にとって異物である抗原に対しては獲得免疫応答システムを作動させるが、自己の生体成分（自己抗原）に対しては免疫応答を示さない免疫寛容を有している。しかしながら、何らかの原因で免疫寛容の破綻が起こると、自己抗原に対する免疫応答が起こり前述と同様のメカニズムにより自己抗原反応性T細胞が誘導され免疫異常状態に陥り、種々の自己免疫疾患が惹起される。

## 【0016】

即ち、生体の免疫システムが正常な状態では、正常組織の無刺激の抗原提示細胞（antigen presenting cell; APC）はコストイミュレーター分子を発現しないため、例えば自己抗原に反応する自己抗原反応性T細胞が存在していても、T細胞が不応答状態に陥っているため自己寛容が維持されているが、免疫異常状態においては過剰または継続的なコストイミュレーター分子の発現以上により自己抗原反応性T細胞が活性化され自己免疫疾患が惹起されるという可能性が提示されている。

このような観点から近年、コストイミュレーターシグナルの伝達、例えば前述のCD28/CTLA-4-CD80/CD86の間のシグナル伝達を調節することにより種々の自己免疫性疾患の治療の試みが多数なされてきている。

しかしながら、そのような治療の試みがなされる一方で、コストイミュレーター分子及び関連する分子との間の相互作用（換言すれば、それらの分子間の結合を介した細胞間接着）によるT細胞の活性化のメカニズムの詳細な解明は未だなされておらず、またこのメカニズムには未だ同定されていない他の分子が関与する可能性も残っている。

【0017】

最近本発明者らは、前記「CD28」や「CTLA-4」と同様に、T細胞等のリンパ球の活性化に必須な第2のシグナル（コスティミュレイトリーシグナル）の伝達、並びに該シグナルに連動して活性化T細胞等の活性化リンパ球の機能制御を行う分子であると考えられる新規な哺乳動物（ヒト、マウス及びラット）由来の細胞膜表面分子を同定及び単離することに成功し、その分子を「JTT-1抗原」または「JTT-2抗原」と命名した（日本国特許出願公開11-29599号公報、及び国際特許出願公開W098/38216号）。なお、後に本発明者らはこれらの分子をAILIM (activation inducible lymphocyte immunomodulatory molecule) と改名した。

本発明者らによるこれまでの研究から、この新分子AILIMが下記のような知見が得られている。

【0018】

(1) T細胞の活性化に重要なコスティミュレイトリーシグナルを細胞間接着を介して伝達するT細胞等のリンパ球の細胞表面分子である「CD28」並びに該シグナルに連動して活性化T細胞等の活性化リンパ球の機能制御を行うT細胞等のリンパ球の細胞表面分子である「CTLA-4」と下記のような類似性を有する。

- ①システイン残基を含む20以上のアミノ酸残基が良く保存されている。
- ②リガンド結合領域として必須なプロリン残基の連続する配列「Pro-Pro-Pro (PPP)」が細胞外領域に保存されている。
- ③シグナル伝達領域として必須な配列「Tyr-Xaa-Xaa-Met (YxxM) (Xaa及びxは任意のアミノ酸を意味する。）」が細胞内領域に保存されている。
- ④「マウスAILIM (マウスJTT-1抗原)」をコードする遺伝子のマウス染色体上での位置は、マウスの「CD28」及び「CTLA-4」の位置と同く、「1C3」である。

【0019】

(2) 細胞間接着を媒介する機能を有する「CD28」及び「CTLA-4」と同様に、「AILIM (JTT-1抗原)」は胸腺細胞、ConAなどのマイトジェンで刺激したリンパ芽球及び胸腺腫細胞の細胞間接着を媒介する能力を有する。

【0020】

(3) AILIMは、少なくとも胸腺細胞、ConAなどのマイトジェンで刺激したリンパ芽球細胞（活性化Tリンパ芽球細胞や活性化Bリンパ芽球細胞）、末梢血リンパ球及び胸腺腫細胞で強く発現する。

【0021】

(4) AILIM (JTT-1抗原) に対する抗体は、ヒト末梢血リンパ球を有意に増殖させ、またその増殖は、T細胞の活性化に必須な抗原提示細胞からの第1のシグナルを受け取るT細胞上のTcR/CD3複合体を構成するCD3に対するモノクローナル抗体を共存させることによりさらに高い増殖を誘導する。

【0022】

(5) AILIM (JTT-1抗原) に対する抗体を、実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) に投与することにより、その病状が抑制がされる。

【0023】

(6) AILIM (JTT-1抗原) に対する抗体を、糸球体基底膜 (GBM) 腎炎のモデルラットに投与することにより、その病状が抑制がされる。

【0024】

本発明者らによるAILIMの同定及び性状解析の報告より後になって、クロチェク (Krocze) らのグループにより、ヒト由来のAILIMと同一の分子であるICOS (inducible co-stimulator) または8F4と命名した分子の同定の報告がなされている (Nature, Vol.397, p.263-266, 1999、及び国際特許出願公開W099/15553号)。

AILIM (別名: JTT-1抗原、JTT-2抗原、ICOS、または8F4) については、上述の3つの報告があるのみであり、その生物学的機能並びに疾患との関わりについては未だ詳細に解明されていない。

【0025】

【発明が解決しようとする課題】

即ち、本発明は、前記「CD28」や「CTLA-4」と同様に、T細胞等のリンパ球の活性化に必須な第2のシグナル (コスティミュレトリシグナル) の伝達、並びに該シグナルに連動して活性化T細胞等の活性化リンパ球の機能制御を行う分子であると考えられる新規分子AILIMの生物学的機能並びにAILIMの発現と疾患と

の関わりを明らかにするとともに、該AILIMの生物学的機能を医学及び薬学的手法（例えば、低分子化合物及び抗体等の薬剤）により制御することによりAILIMの発現の状態に依存する種々の疾患の発症を抑制し、または該疾患を治療する方法及び薬剤を提供することを目的とする。

【0026】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、哺乳動物のAILIMの生物学的機能、AILIMの種々細胞での発現の状態、及びAILIMの発現と疾患との関連性に関して、鋭意研究を重ねた結果、上述したこれまでに得られているAILIMに関する知見に加えて、さらに下記知見を見出し本発明を完成するに至った。

【0027】

(I) 正常リンパ組織である胸腺のT細胞においては、AILIMの発現はCD3の発現の増加に伴い増加する。一方、対照的に、コストイミュレイトリー分子であるCD28の発現はCD3の発現の減少に伴い減少する。正常胸腺T細胞においては、AILIMの発現とCD28の発現は相反する動態を示した。

【0028】

(II) 正常リンパ組織である脾臓及びリンパ節のT細胞では、CD4陽性T細胞の極少数（CD4陽性T細胞の約1乃至3%）においてAILIMの発現が認められる。

【0029】

(III) *P.acnes* (*Propionibacterium acnes*) 及びLPS (*Lipopolysaccharide*) を投与することにより誘導した肝炎モデル動物の肝臓組織浸潤CD4陽性T細胞（単核細胞）においては、AILIMの顕著な発現が認められる。その発現は正常脾臓由来のCD4陽性細胞でのAILIMの発現に比べ著しいものである。

【0030】

(IV) 関節リウマチ患者の関節滑液中の関節組織浸潤T細胞においては、同患者の末梢血中のT細胞及び健常人の末梢血中のT細胞のいずれに比べても、有意に高いAILIMの発現が認められる。

【0031】

(V) 末梢リンパ組織由来のT細胞においては、抗CD3抗体、コンカナバリンA



(Concanavalin A; ConA)、またはPMA (phorbol myristate acetate) とIonophoreで刺激すると約3乃至6時間後にAILIMの発現の上昇が認められ、刺激から約24時間以降でAILIMの高い発現が認められる。また、その発現は、約48時間後でも同程度の発現が維持される。

【0032】

(VI) AILIMは、Th2タイプのサイトカイン産生の性状を有する株化T細胞 (D10, MS202, CD28K0, EL-4など) でコンスティテューティブ (constitutive) な発現が認められる。また、それらの細胞株でのAILIMの発現は、CD28の発現と同等またはそれ以上に高い発現である。

【0033】

(VII) 正常脾臓、胸腺及び末梢血の各々から単離したT細胞を、本発明を構成する抗AILIM抗体及び抗CD3抗体の両方をコーティングしたプレート中で培養すると、当該T細胞からのサイトカインの産生及び細胞増殖が促進される。

【0034】

(VIII) ConAまたはPMAで刺激した末梢血由来T細胞を、本発明を構成する抗AILIM抗体及び抗CD3抗体の両方をコーティングしたプレート中で培養すると、当該T細胞からのサイトカインの産生及び細胞増殖が促進される。また、この結果は、ConAまたはPMAで刺激した末梢血由来T細胞を、抗CD28抗体及び抗CD3抗体の両方をコーティングしたプレート中で培養した場合の結果と同等である。

【0035】

(IX) 正常脾臓及び胸腺の各々から単離した胸腺細胞及び脾臓細胞 (各々粘着性細胞を除去) を抗CD3抗体をコーティングしたプレート中で培養することによりT細胞反応を惹起したT細胞に、本発明を構成する抗AILIM抗体を添加すると、該T細胞からのサイトカイン (例えば、インターフェロン $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、インターロイキン4 (IL-4) など) の産生が抑制されるとともに、該T細胞の増殖が抑制される。また、該抗AILIM抗体によるT細胞反応 (前記サイトカイン産生、細胞増殖など) の抑制は、抗体の濃度に依存するものである。一方、抗AILIM抗体の代わりに抗CD28抗体を加える場合には、抗AILIM抗体を用いた場合の結果を逆に該T細胞反応が増強される。

【 0 0 3 6 】

(X) *P.acnes* (*Propionibacterium acnes*) 及びLPS (Lipopolysaccharide) を投与することにより誘導した肝炎モデル動物に、本発明を構成する抗AILIM抗体を投与すると、抗体濃度依存的に血中のIFN- $\gamma$ の上昇が有意に抑制されるとともに、GOT/GPTの上昇が有意に抑制される。

【 0 0 3 7 】

(XI) 結核死菌を投与することによる誘導した関節炎モデル動物に、本発明を構成する抗AILIM抗体を投与すると、抗体濃度依存的に足腫れが有意に抑制されるとともに、関節炎の種々のパラメーターの上昇が有意に抑制される。

【 0 0 3 8 】

(XII) 移植片対宿主病 (graft versus host disease; GVHD) のモデル動物に、本発明を構成する抗AILIM抗体を投与すると、移植片対宿主反応 (GVH reaction) の産物であるIgG及びIgEの産生が有意に抑制されるとともに、自己抗体価の指標である抗dsDNA抗体の産生の上昇が有意に抑制される。

【 0 0 3 9 】

(XIII) 外来抗原としてのヒツジ赤血球 (sheep red blood cell; SRBC) を感作することにより誘導した過剰な外来抗原に対する抗体産生を起こすモデル動物に、本発明を構成する抗AILIM抗体を投与 (感作直後または数日後) すると、外来抗原である該SRBCに対する抗体の産生の上昇が有意に抑制される。また、その抑制効果は、CTLA4-Igを投与した場合の抑制効果よりも高いものである。

【 0 0 4 0 】

即ち、本発明は、下記 (1) 乃至 (2 3) に記載されたとおりの発明である。

(1) AILIMに結合しAILIM発現細胞の増殖を抑制するか、またはAILIMに結合しAILIM発現細胞によるサイトカインの産生を抑制する活性を有する物質並びに薬学的に許容され得る担体を含んでなる関節症を抑制または治療するための医薬組成物。

(2) 該サイトカインが、Th1タイプのT細胞が産生するサイトカインであるインターフェロン $\gamma$ であるか、またはTh2タイプのT細胞が産生するサイトカインであるインターロイキン4であることを特徴とする前記 (1) に記載の医薬

組成物。

(3) 該関節症が関節リウマチであることを特徴とする前記(1)または前記(2)に記載の医薬組成物。

(4) 該関節症が変形性関節症であることを特徴とする前記(1)または前記(2)に記載の医薬組成物。

(5) 該物質が蛋白性物質であることを特徴とする前記(1)乃至前記(4)のいずれかに記載の医薬組成物。

(6) 該蛋白性物質がポリペプチド、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体または該モノクローナル抗体の一部であることを特徴とする前記(5)に記載の医薬組成物。

(7) 該物質が非蛋白性物質であることを特徴とする前記(1)乃至前記(4)のいずれかに記載の医薬組成物。

(8) 該非蛋白性物質がDNA、RNAまたは化学的に合成された化合物であることを特徴とする前記(7)に記載の医薬組成物。

【0041】

(9) AILIMに結合しAILIM発現細胞の増殖を抑制するか、またはAILIMに結合しAILIM発現細胞によるサイトカインの産生を抑制する活性を有する物質並びに薬学的に許容され得る担体を含んでなる炎症を抑制または治療するための医薬組成物。

(10) 該サイトカインが、Th1タイプのT細胞が産生するサイトカインであるインターフェロン $\gamma$ であるか、またはTh2タイプのT細胞が産生するサイトカインであるインターロイキン4であることを特徴とする前記(9)に記載の医薬組成物。

(11) 該炎症が肝炎であることを特徴とする前記(9)または前記(10)に記載の医薬組成物。

(12) 該物質が蛋白性物質であることを特徴とする前記(9)乃至前記(11)のいずれかに記載の医薬組成物。

(13) 該蛋白性物質がポリペプチド、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体または該モノクローナル抗体の一部であることを特徴とする前記(12)

に記載の医薬組成物。

(14) 該物質が非蛋白性物質であることを特徴とする前記(9)乃至前記(11)のいずれかに記載の医薬組成物。

(15) 該非蛋白性物質がDNA、RNAまたは化学的に合成された化合物であることを特徴とする前記(14)に記載の医薬組成物。

【0042】

(16) AILIMに結合しAILIM発現細胞の増殖を抑制するか、またはAILIMに結合しAILIM発現細胞によるサイトカインの産生を抑制する活性を有する物質並びに薬学的に許容され得る担体を含んでなる移植片対宿主反応を抑制または移植片対宿主病を治療するための医薬組成物。

(17) 該サイトカインが、Th1タイプのT細胞が産生するサイトカインであるインターフェロン $\gamma$ であるか、またはTh2タイプのT細胞が産生するサイトカインであるインターロイキン4であることを特徴とする前記(16)に記載の医薬組成物。

(18) 該物質が蛋白性物質であることを特徴とする前記(16)または前記(17)に記載の医薬組成物。

(19) 該蛋白性物質がポリペプチド、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体または該モノクローナル抗体の一部であることを特徴とする前記(18)に記載の医薬組成物。

(20) 該物質が非蛋白性物質であることを特徴とする前記(16)または前記(17)に記載の医薬組成物。

(21) 該非蛋白性物質がDNA、RNAまたは化学的に合成された化合物であることを特徴とする前記(20)に記載の医薬組成物。

【0043】

(22) AILIMに結合しAILIM発現細胞の増殖を抑制するか、またはAILIMに結合しAILIM発現細胞によるサイトカインの産生を抑制する活性を有する物質並びに薬学的に許容され得る担体を含んでなる外来抗原または自己抗原による免疫感作により惹起される該抗原に対する抗体の産生を抑制するための医薬組成物。

(23) 該サイトカインが、Th1タイプのT細胞が産生するサイトカインで

あるインターフェロン $\gamma$ であるか、またはTh2タイプのT細胞が産生するサイトカインであるインターロイキン4であることを特徴とする前記(22)に記載の医薬組成物。

(24) 該物質が蛋白性物質であることを特徴とする前記(22)または前記(23)に記載の医薬組成物。

(25) 該蛋白性物質がポリペプチド、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体または該モノクローナル抗体の一部であることを特徴とする前記(24)に記載の医薬組成物。

(26) 該物質が非蛋白性物質であることを特徴とする前記(22)または前記(23)に記載の医薬組成物。

(27) 該非蛋白性物質がDNA、RNAまたは化学的に合成された化合物であることを特徴とする前記(26)に記載の医薬組成物。

#### 【0044】

##### 【発明の実施の形態】

以下、本発明で用いられる抗体の一般的製造方法、並びに本発明で用いる語句の意味を明らかにすることにより、本発明を詳細に説明する。

本発明における「哺乳動物」とは、ヒト、ウシ、ヤギ、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、及びモルモット等を意味し、好ましくは、ヒト、ウシ、ラット、マウスまたはハムスターであり、特に好ましくは、ヒトである。

#### 【0045】

本発明における「AILIM」とは、「activation inducible lymphocyte immunomodulatory molecule」の略称である。このAILIMは、最近本発明者らが同定、単離し、日本国特許出願公開平11-29599号公報(平成10年特許出願第62217号)及び対応する国際特許出願公開W098/38216号公報(国際特許出願番号PCT/JP98/00837)中において報告した「JTT-1抗原」または「JTT-2抗原」と命名した哺乳動物由来の新規細胞膜表面分子を意味する。

具体的には、上記特許出願公開公報において、配列番号1に記載されるアミノ酸配列を有するヒトAILIM(ヒトJTT-1抗原)、配列番号4または配列番号6のいずれかに記載されるアミノ酸配列を有するラットAILIM(ラットJTT-1抗原)並び

に配列番号5に記載されるアミノ酸配列を有するマウスAILIM（マウスJTT-1抗原）を意味する。

【0046】

ヒトAILIMと全く同一のヒト由来分子について、クロチェク（KroczeK）らのグループが、本発明者らによる前記2つの特許出願の公開公報の公開日より後に公開された2つの文献中で報告している。彼らはそのヒト由来分子を、ICOS（inducible co-stimulator）または8F4と命名している（国際特許出願公開W099/15553号公報、及びNature, Vol.397, p.263-266, 1999）。当該ICOSまたは8F4と命名されたヒト由来の分子もヒトAILIMと同一分子として本願に取り入れられる。

【0047】

また、本発明で言う「AILIM」には、該既報の文献中に記載された各々の哺乳動物のAILIMのアミノ酸配列、特に好ましくはヒトAILIMのアミノ酸配列（日本国特許出願公開平11-29599号公報及び対応する国際特許出願公開W098/38216号公報に記載される配列番号2に記載されるアミノ酸配列）と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドも包含される。

【0048】

ここで「実質的に同一のアミノ酸配列を有する」とは、該既報のアミノ酸配列を含むポリペプチドと実質的に同等の生物学的性質を有する限り、該アミノ酸配列中の複数個のアミノ酸、好ましくは1乃至10個のアミノ酸、特に好ましくは1乃至5個のアミノ酸が置換、欠失及び／または修飾されているアミノ酸配列を有するポリペプチド、並びに該アミノ酸配列に、複数個のアミノ酸、好ましくは1乃至10個のアミノ酸、特に好ましくは1乃至5個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドも本願発明の「AILIM」の範囲に包含されることを意味する。

そのようなアミノ酸の置換、欠失、または挿入は常法に従って行うことができる（実験医学別冊・「遺伝子工学ハンドブック」（1992）など）。

【0049】

例えば、合成オリゴヌクレオチド指定突然変異導入法（gapped duplex）法、亜硝酸あるいは亜硫酸処理によってランダムに点突然変異を導入する方法、Ba13

1酵素等により欠失変異体を作製する方法、カセット変異法、リンカースキャニング法、ミスインコーポレーション法、ミスマッチプライマー法、DNAセグメント合成法などを挙げることができる。

【0050】

合成オリゴヌクレオチド指定突然変異導入 (gapped duplex) 法は、例えば下記のように行うことができる。アンバー変異をもつM13ファージベクターに変異誘起を希望する領域をクローニングし、一本鎖ファージDNAを調製する。アンバー変異をもたないM13ベクターのRFIDNAを制限酵素処理により線状とし、上記の一本鎖ファージDNAと混合して変性後、アニールさせ、「gapped duplex DNA」を形成させる。これに変異を導入した合成オリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせ、DNAポリメラーゼとDNAリガーゼの反応により閉環状2本鎖DNAとする。このDNAをミスマッチ修飾能が欠損している大腸菌mutS株にトランスフェクションし、増殖したファージをサプレッサー機能のない大腸菌に感染させ、アンバー変異を持たないファージだけを選択する。

【0051】

また、亜硝酸による点突然変異を導入する方法は、例えば下記のような原理を利用する。DNAを亜硝酸処理すると塩基が脱アミノ化されて、アデニンはヒポキサンチンに、シトシンはウラシルに、グアニンはキサンチンになる。脱アミノ化されたDNAを細胞に導入すると、DNA複製時にヒポキサンチンはシトシンと、ウラシルはアデニンとキサンチンはチミンと塩基対を形成するため、「A:T」が「G:C」へ、「G:C」が「A:T」へと置換する。実際には亜硝酸処理した一本鎖DNA断片を「gapped duplex DNA」にハイブリダイズさせ、以下、合成オリゴヌクレオチド指定突然変異導入 (gapped duplex) 法と同様に操作して変異株を分離すればよい。

【0052】

本発明における「マイトジェン」とは、分裂促進剤とも呼ばれ、細胞分裂を誘起する物質を指す。免疫学的には、抗原非特異的（ポリクローナル）にリンパ球を幼弱化し分裂を誘起させるものを意味する。例えば、PHAやPWMなどのレクチン、コンカナバリンA (Concanavalin A; ConA)、リボ多糖、ストレプトリシンS

、抗リンパ球抗体などが挙げられる。コンカナバリンAやPHAは、Tリンパ球のみに作用し、リボ多糖はBリンパ球のみに作用し、PWMは両リンパ球に作用することが知られている。

【0053】

本願明細書中で用いられる「リンパ芽球細胞」なる用語は、大リンパ球、リンホ بلاスト (lymphoblast) あるいは免疫芽細胞とも呼ばれ、リンパ性組織 (リンパ節、脾臓、胸腺、骨髓、リンパ管、扁桃腺など) や血液中に存在するリンパ球の内の大リンパ球に属するリンパ球を指す。

【0054】

本願明細書中で用いられる「活性化リンパ球」なる用語は、例えば下記のようなリンパ球を意味するがこの限りではない。例えば、何らかの刺激により活性化されたリンパ球を指す。リンパ球は、T細胞、B細胞、およびナチュラルキラー細胞に分類され、さらにT細胞についてはCD4陽性細胞とCD8陽性細胞に分類することができる。従って、本発明で言う「活性化リンパ球」には、主に活性化T細胞、活性化B細胞、および活性化ナチュラルキラー細胞が含まれ、さらに活性化T細胞には活性化CD4陽性細胞と活性化CD8陽性細胞が含まれる。

【0055】

CD4陽性T細胞は、抗原提供細胞によって提示された抗原に反応すると、いろいろなサイトカイン (IFN $\gamma$ 、IL-4など) を分泌し、それらのサイトカインに対するレセプターなどが新たに発現し、細胞自身も大きくなり、分裂を始め、増殖して活性化される。活性化CD4陽性T細胞とは、このような状態のCD4陽性T細胞を指す。

【0056】

CD8陽性T細胞は、抗原に反応するとIL-2Rを発現し、それにIL-2が作用すると細胞障害性をもつCTLに分化し、次に同じ抗原ペプチド/MHCクラスI複合体に出会った時にその標的細胞を破壊して殺すようになる。CD8陽性T細胞がCTLに分化すると、細胞質内に顆粒が増加してくる。この顆粒の中にはいろいろな高分子タンパク質が含まれており、パーフォリンはその代表である。パーフォリンは補体の第5-9成分で構成されるMACによく似ており、標的細胞の細胞膜に穴をあける作



用がある。その他、セリンプロテアーゼやLT、プロテオグリカン (proteoglycan) なども含まれている。また、CTLに分化して抗原刺激を受けるとIFN  $\gamma$ 、LT、TNFあるいはIL-2などのリンフォカインも分泌する。活性化CD8陽性T細胞とは、このような状態のCD8陽性T細胞を指す。

【0057】

T細胞は汎血球凝集素 (植物凝集素、PHA) やコンカナバリンA (Con A) に反応して芽球化現象を示すが、このような状態のT細胞も活性化T細胞に含まれる。

【0058】

B細胞では、B7分子を発現し、TCRとともに表面のCD28を刺激してそのヘルパーT細胞を活性化し、CD40Lを発現させたり、リンフォカインを産生したりし、刺激を受けて細胞が大きくなったり、増殖を起こすなどの変化が見られる。活性化B細胞とは、このような状態のB細胞を指し、本発明においては、抗体を分泌するようになったB細胞 (抗体分泌細胞 (antibody-secreting cell) 及び形質細胞 (plasma cell)) も活性化B細胞に含まれる。

活性化ナチュラルキラー細胞とは、前述のとおり腫瘍細胞やウイルス感染細胞の障害作用を示すナチュラルキラー細胞を指す。なお、本発明においては、コンカナバリンA (Con A) で刺激された胸腺細胞も活性化リンパ球に含まれる。

【0059】

本発明において用いられる「活性化リンパ芽球細胞」には、前記のような「リンパ芽球」が、コンカナバリンAのような前記「マイトジェン」で刺激を受けて活性化されたリンパ芽球が含まれる。

【0060】

本願明細書で場合によって用いられる「静止期リンパ球」なる用語は、前述の活性化リンパ球と対照的に、細胞の活性化のための刺激を受けていない非活性化状態のリンパ球を指す。

【0061】

本発明を構成する「AILIM発現細胞によるサイトカインの産生」における「サイトカイン」とは、AILIMを発現する細胞 (特に、T細胞) が産生する任意のサイトカインを意味する。該T細胞は、Th1タイプのT細胞及びTh2タイプのT細胞

が挙げられ、本発明における該サイトカインは、特にそれらTh1タイプのT細胞が産生するサイトカイン及び／またはTh2タイプのT細胞が産生する任意のサイトカインを意味する。

Th1タイプのT細胞が産生するサイトカインとしては、IFN- $\gamma$ 、IL-2、TNF、IL-3などが挙げられ、またTh2タイプのT細胞が産生するサイトカインとしては、IL-1-3、IL-4、IL-5、IL-10、TNFなどが挙げられる（細胞、Vol.30, No.9, p.343-346, 1998）。

#### 【0062】

本発明を構成する「物質」、具体的には「AILIMに結合しAILIM発現細胞の増殖を抑制するか、またはAILIMに結合しAILIM発現細胞によるインターフェロン $\gamma$ 若しくはインターロイキン4の産生を抑制する活性を有する物質」には、自然界に存在する天然の物質あるいは人工的に調製される任意の物質を意味する。

該物質は、「蛋白性物質」と「非蛋白性物質」に大別することができる。

#### 【0063】

該「蛋白性物質」としては、後述するポリペプチド、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、または該モノクローナル抗体の一部が挙げられる。

該物質が抗体である場合には、好ましくはモノクローナル抗体である。該物質がモノクローナル抗体である場合には、非ヒト哺乳動物由来のモノクローナル抗体だけでなく、後述する組換えキメラモノクローナル抗体、組換えヒト型モノクローナル抗体及びヒトモノクローナル抗体が包含される。

#### 【0064】

該物質が、ポリペプチドである場合には、後述するポリペプチド、該ポリペプチドの断片（オリゴペプチド）、融合ポリペプチド、及びそれらいずれかの化学修飾体が包含される。オリゴペプチドとしては、5乃至30個のアミノ酸、好ましくは5乃至20個のアミノ酸からなるペプチドを挙げることができる。該化学修飾は、生体に投与された場合の血中半減期の増大あるいは経口投与時における消化管での分解に対する耐性若しくは吸収性の増大の目的等の種々の目的に応じて設計することができる。

#### 【0065】

該「非蛋白性物質」としては、DNA、RNA及び化学的に合成された化合物が挙げられる。

ここで、「DNA」とは、前述のAILIM（好ましくはヒトAILIM）をコードするDNA（cDNA及びゲノミックDNAを含む）の塩基配列を基に設計されるアンチセンスDNA医薬として有用な「該DNAの部分塩基配列を含むDNAあるいはそれらを化学修飾した化学修飾DNA」を意味する。即ち、該アンチセンスDNAは、AILIMをコードするDNAまたはRNAにハイブリダイズすることにより、該AILIMをコードするDNAのmRNAへの転写あるいは該mRNAの蛋白への翻訳を阻害することができる。

【0066】

ここで、「部分塩基配列」とは、任意の部位における任意の数の塩基からなる部分塩基配列を意味する。該部分塩基配列としては、連続した5乃至100塩基の部分塩基配列が挙げられ、好ましくは、連続した5乃至70塩基の部分塩基配列、さらに好ましくは連続した5乃至50塩基の部分塩基配列、より好ましくは連続した5乃至30塩基の部分塩基配列が挙げられる。

【0067】

また、該DNAをアンチセンス医薬として用いる場合には、該DNAが患者の体内に投与された場合の血中半減期の増大（安定性）、細胞内膜の透過性の増大、あるいは経口投与の場合の消化器官での分解耐性の増大若しくは吸収の増大などの目的のために、該DNAの塩基配列の一部に化学修飾を施すことが可能である。化学修飾としては、例えば、オリゴヌクレオチドの構造中のリン酸結合、リボース、核酸塩基、糖部位、3'及び/または5'末端等の化学修飾が挙げられる。

リン酸結合の修飾としては、1以上の該結合を、ホスホジエステル結合（D-オリゴ）、ホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合（S-オリゴ）、メチルホスホネート結合（MP-オリゴ）、ホスホロアミデート結合、非リン酸結合及びメチルホスホノチオエート結合のいずれかまたはそれらの組み合わせへの変更を挙げることができる。リボースの修飾としては、2'-フルオロリボースあるいは2'-O-メチルリボースへなどへの変更を挙げることができる。核酸塩基の修

飾としては、5-プロピニルウラシルまたは2-アミノアデニンなどへの変更が挙げられる。

【0068】

ここで、「RNA」とは、前述のAILIM（好ましくはヒトAILIM）をコードするRNAの塩基配列を基に設計されるアンチセンスRNA医薬として有用な「該RNAの部分塩基配列を含むRNAあるいはそれらを化学修飾した化学修飾RNA」を意味する。該アンチセンスRNAは、AILIMをコードするDNAにハイブリダイズすることにより、該AILIMをコードするDNAまたはRNAにハイブリダイズすることにより、該AILIMをコードするDNAのmRNAへの転写あるいは該mRNAの蛋白への翻訳を阻害することができる。

【0069】

ここで、「部分塩基配列」とは、任意の部位における任意の数の塩基からなる部分塩基配列を意味する。該部分塩基配列としては、連続した5乃至100塩基の部分塩基配列が挙げられ、好ましくは、連続した5乃至70塩基の部分塩基配列、さらに好ましくは連続した5乃至50塩基の部分塩基配列、より好ましくは連続した5乃至30塩基の部分塩基配列が挙げられる。

該アンチセンスRNAは、該RNAが患者の体内に投与された場合の血中半減期の増大、細胞内膜の透過性の増大、あるいは経口投与の場合の消化器官での分解耐性の増大若しくは吸収の増大などの目的のために、該RNAの塩基配列の一部に化学修飾を施すことが可能である。化学修飾としては、例えば、前述のアンチセンスDNAに適用されるような化学修飾を挙げることができる。

【0070】

「化学的に合成された化合物」とは、上述のDNA、RNA及び蛋白性物質を除く任意の化合物であって、分子量約100乃至約1000以下の化合物、好ましくは分子量約100乃至約800の化合物であり、より好ましくは分子量約100乃至約600の化合物を挙げることができる。

【0071】

前記「物質」の定義に包含される「ポリペプチド」とは、AILIMを構成するポリペプチド鎖の一部（断片）を意味し、好ましくはAILIMを構成するポリペプチ

ドの細胞外領域またはその一部を意味する（該領域は所望応じそのN末端及び／またはC末端に1乃至5のアミノ酸が付加されていてもよい。）。

本発明に係るAILIMは、1または2のポリペプチド鎖により構成される細胞膜を貫通する細胞膜貫通分子である。

【0072】

ここで「細胞膜貫通蛋白」とは、多くの受容体あるいは細胞膜表面分子に見られるように、膜の脂質二重層を1回または数回貫通する疎水性ペプチド領域により膜と連結し、全体として細胞外領域(extracellular region)、膜貫通領域(transmembrane region)及び細胞質領域(cytoplasmic region)の3つの主領域から構成される構造をとる蛋白を指す。さらにそのような膜貫通性蛋白は、モノマー(monomer)として、または、同一のアミノ酸配列を有するもう1本の鎖あるいは異なるアミノ酸配列を有する鎖とともにそれぞれホモダイマー(homodimer)、ヘテロダイマー(heterodimer)あるいはオリゴマー(oligomer)を形成して存在することにより、各々の受容体や細胞表面分子を構成する。

【0073】

ここで「細胞外領域」とは、前述のような細胞膜膜貫通蛋白の全体構造のうち、該膜蛋白が連結している膜の外界側に存在する部分構造（部分領域）の全部または一部を意味し、換言すれば、膜内に取り込まれている領域（膜貫通領域）及び該膜内の領域に引き続いて細胞質内に存在する領域（細胞内領域）以外の領域の全部または一部を意味する。

【0074】

前述の「蛋白性物質」に包含される「融合ポリペプチド」とは、AILIMを構成するポリペプチドの細胞外領域と「ヒトの免疫グロブリン(Ig)の重鎖の定常領域または定常領域の一部」とからなる融合ポリペプチドである。好ましくはAILIMの細胞外領域とヒトIgGの重鎖の定常領域の一部との融合ポリペプチドであり、特に好ましくはAILIMの細胞外領域とヒトIgGの重鎖のヒンジ領域、CH2ドメイン及びCH3ドメインからなる領域(Fc)との融合ポリペプチドである。なお、IgGとしては、IgG1が好ましい。また、AILIMとしては、ヒト、マウスまたはラット（好ましくはヒト）のAILIMが好ましい。

【0075】

ここで「ヒトの免疫グロブリン (Ig) の重鎖の定常領域または定常領域の一部」とは、ヒト由来の免疫グロブリンの重鎖 (Heavy Chain, H鎖) の定常領域 (Constant region)、Fc領域またはそれらの一部を意味する。該免疫グロブリンは、どのようなクラス及びサブクラスに属する免疫グロブリンであってもよく、具体的には、IgG (IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4)、IgM、IgA (IgA1及びIgA2)、IgD及びIgEを挙げることができる。好ましくは、IgG (IgG1、IgG2、IgG3若しくはIgG4)、またはIgMである。本発明における特に好ましい例としては、ヒト由来のIgG (IgG1、IgG2、IgG3若しくはIgG4) に属する免疫グロブリンである。

【0076】

免疫グロブリンは、2つの相同な軽鎖 (Light Chain, L鎖) と2つの相同な重鎖 (Heavy Chain, H鎖) の4つの鎖が、ジスルフィド結合 (S-S結合) で結合したY字形の構造単位を有する。軽鎖は、軽鎖可変領域 ( $V_L$ ) 及び軽鎖定常領域 ( $C_L$ ) から構成される。重鎖は、重鎖可変領域 ( $V_H$ ) と重鎖定常領域 ( $C_H$ ) から構成される。

【0077】

重鎖定常領域は、クラス (IgG、IgM、IgA、IgD及びIgE) 並びにサブクラス (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2) 毎に各々固有のアミノ酸配列を有するいくつかのドメインから構成される。

【0078】

IgG (IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4) の重鎖は、N末端から順に、 $V_H$ 、CH1ドメイン、ヒンジ領域、CH2ドメイン及びCH3ドメインから構成される。

【0079】

同様にIgG1の重鎖は、N末端から順に、 $V_H$ 、 $C\gamma_1 1$ ドメイン、ヒンジ領域、 $C\gamma_1 2$ ドメイン及び $C\gamma_1 3$ ドメインから構成される。IgG2の重鎖は、N末端から順に、 $V_H$ 、 $C\gamma_2 1$ ドメイン、ヒンジ領域、 $C\gamma_2 2$ ドメイン及び $C\gamma_2 3$ ドメインから構成される。IgG3の重鎖は、N末端から順に、V

H<sub>1</sub> Cr<sub>3</sub> 1ドメイン、ヒンジ領域、Cr<sub>3</sub> 2ドメイン及びCr<sub>3</sub> 3ドメインから構成される。IgG4の重鎖は、N末端から順に、V<sub>H</sub>、Cr<sub>4</sub> 1ドメイン、ヒンジ領域、Cr<sub>4</sub> 2ドメイン及びCr<sub>4</sub> 3ドメインから構成される。

【0080】

IgAの重鎖は、N末端から順に、V<sub>H</sub>、C<sub>α</sub> 1ドメイン、ヒンジ領域、C<sub>α</sub> 2ドメイン及びC<sub>α</sub> 3ドメインから構成される。

【0081】

同様にIgA1の重鎖は、N末端から順に、V<sub>H</sub>、C<sub>α</sub> 1 1ドメイン、ヒンジ領域、C<sub>α</sub> 1 2ドメイン及びC<sub>α</sub> 1 3ドメインから構成される。IgA2の重鎖は、N末端から順に、V<sub>H</sub>、C<sub>α</sub> 2 1ドメイン、ヒンジ領域、C<sub>α</sub> 2 2ドメイン及びC<sub>α</sub> 2 3ドメインから構成される。

【0082】

IgDの重鎖は、N末端から順に、V<sub>H</sub>、C<sub>δ</sub> 1ドメイン、ヒンジ領域、C<sub>δ</sub> 2ドメイン及びC<sub>δ</sub> 3ドメインから構成される。

【0083】

IgMの重鎖は、N末端から順に、V<sub>H</sub>、C<sub>μ</sub> 1ドメイン、C<sub>μ</sub> 2ドメイン、C<sub>μ</sub> 3ドメイン及びC<sub>μ</sub> 4ドメインから構成され、IgG、IgA及びIgDに見られるようなヒンジ領域を有しない。

【0084】

IgEの重鎖は、N末端から順に、V<sub>H</sub>、C<sub>ε</sub> 1ドメイン、C<sub>ε</sub> 2ドメイン、C<sub>ε</sub> 3ドメイン及びC<sub>ε</sub> 4ドメインから構成され、IgG、IgA及びIgDに見られるようなヒンジ領域を有しない。

【0085】

さらに、IgGを例に挙げるならば、IgGをパパインで処理すると、2つの重鎖を連結させているヒンジ領域中に存在するジスルフィド結合のややN末端側で切断されて、V<sub>H</sub>及びC<sub>H</sub> 1からなる重鎖断片と1つの軽鎖がジスルフィド結合で連結した2つの相同なFab、並びにヒンジ領域、C<sub>H</sub> 2ドメイン及びC<sub>H</sub> 3ドメインからなる2つの相同な重鎖断片がジスルフィド結合で連結した1つのFcを生ずる（以上、「免疫学イラストレイテッド」、原書第2版、第65～75頁、1

992年、南江堂発行、及び「最新医科学の焦点「免疫系の認識機構」」、第4～7頁、1991年、南江堂発行など参照）。

【0086】

即ち、上述の「免疫グロブリンの重鎖の定常領域の一部」とは、上述のような構造的特徴を有する免疫グロブリンの重鎖の定常領域一部を意味し、好ましくは、C1ドメインを欠く定常領域またはFc領域である。具体的には、IgG、IgAまたはIgDの場合には、各々のヒンジ領域、C2ドメイン及びC3ドメインからなる領域が挙げられ、IgMまたはIgEの場合には、各々のC2ドメイン、C3ドメイン及びC4ドメインからなる領域が挙げられる。とりわけ好ましい例としては、ヒト由来のIgG1のFc領域を挙げることができる。

【0087】

上述の融合ポリペプチドは、前述のようなIgG等の免疫グロブリンの定常領域の一部（例えば、Fc）を融合パートナーとして有することから、該免疫グロブリン断片に特異的に結合するというプロテインAの性質を用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いることにより該融合ポリペプチドを極めて容易に精製することが可能であるという点で利点を有する。さらに、種々の免疫グロブリンのFcに対する種々の抗体が提供されていることから、該Fcに対する抗体を用いて、該融合ポリペプチドのイムノアッセイを簡便に行うことができる。

【0088】

上述したポリペプチド、該ポリペプチドの一部（断片）及び融合ポリペプチドは、後述するような遺伝子組換え技術のほか、化学的合成法、細胞培養方法等のような当該技術的分野において知られる公知の方法あるいはその修飾方法を適宜用いることにより製造することができる。

本発明における「抗体」とは、前記で定義した哺乳動物のAILIM（特に好ましくはヒトAILIM）に対するポリクローナル抗体（抗血清）あるいはモノクローナル抗体を意味し、好ましくはモノクローナル抗体である。

具体的には、AILIMに結合しAILIM発現細胞の増殖を抑制するか、またはAILIMに結合しAILIM発現細胞によるインターフェロン $\gamma$ 若しくはインターロイキン4の産生を抑制する活性を有する抗体である。



## 【0089】

本発明の「抗体」は、本発明のAILIMを発現する細胞（天然の細胞、株化細胞、腫瘍細胞など）、AILIMをその細胞表面に高発現するように遺伝子組換技術を用いて作製された形質転換体、AILIMを構成するポリペプチド、該AILIMポリペプチド、またはAILIMの細胞外領域を含む前述の融合ポリペプチドを抗原として用い、該抗原をマウス、ラット、ハムスター、モルモットあるいはウサギ等の哺乳動物に免疫して得られる天然型抗体、遺伝子組換技術を用いて製造され得るキメラ抗体及びヒト型抗体（CDR-grafted抗体）、並びにヒト抗体産生トランスジェニック動物等を用いて製造され得るヒト抗体も包含する。

## 【0090】

モノクローナル抗体には、IgG、IgM、IgA、IgDあるいはIgE等のいずれのアイソタイプを有するモノクローナル抗体もが包含される。好ましくは、IgGまたはIgMである。

## 【0091】

ポリクローナル抗体（抗血清）あるいはモノクローナル抗体は、既存の一般的な製造方法によって製造することができる。即ち、例えば、前述のような抗原を、必要に応じてフロイントアジュバント（Freund's Adjuvant）とともに、哺乳動物、好ましくは、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、ヤギ、ウマあるいはウシ、より好ましくはマウス、ラット、ハムスター、モルモットまたはウサギに免疫する。

## 【0092】

ポリクローナル抗体は、該免疫感作動物から得た血清から取得することができる。またモノクローナル抗体は、該免疫感作動物から得た該抗体産生細胞と自己抗体産生能のない骨髓腫系細胞（ミエローマ細胞）からハイブリドーマを調製し、該ハイブリドーマをクローン化し、哺乳動物の免疫に用いた抗原に対して特異的親和性を示すモノクローナル抗体を産生するクローンを選択することによって製造される。

## 【0093】

モノクローナル抗体は、具体的には下記のようにして製造することができる。

即ち、前述のような抗原を免疫原とし、該免疫原を、必要に応じてフロイントアジュバント (Freund's Adjuvant) とともに、非ヒト哺乳動物、具体的には、マウス、ラット、ハムスター、モルモットあるいはウサギ、好ましくはマウス、ラットあるいはハムスター（後述するヒト抗体産生トランスジェニックマウスのような他の動物由来の抗体を産生するように作出されたトランスジェニック動物を含む）の皮下内、筋肉内、静脈内、フッドパッド内あるいは腹腔内に1乃至数回注射するかあるいは移植することにより免疫感作を施す。通常、初回免疫から約1乃至14日毎に1乃至4回免疫を行って、最終免疫より約1乃至5日後に免疫感作された該哺乳動物から抗体産生細胞が取得される。免疫を施す回数及び時間的インターバルは、使用する免疫原の性質などにより、適宜変更することができる。

【0094】

モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの調製は、ケーラー及びミルシュタインらの方法（ネイチャー (Nature)、第256巻、第495～第497頁、1975年）及びそれに準じる修飾方法に従って行うことができる。即ち、前述の如く免疫感作された非ヒト哺乳動物から取得される脾臓、リンパ節、骨髄あるいは扁桃等、好ましくは脾臓に含まれる抗体産生細胞と、好ましくはマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギまたはヒト等の哺乳動物、より好ましくはマウス、ラットまたはヒト由来の自己抗体産生能のないミエローマ細胞との細胞融合させることにより調製される。

【0095】

細胞融合に用いられるミエローマ細胞としては、例えばマウス由来ミエローマ P3/X63-Ag8.653 (653)、P3/NSI/1-Ag4-1 (NS-1)、P3/X63-Ag8.U1 (P3U1)、SP2/0-Ag14 (Sp2/0、Sp2)、PA1、F0あるいはBW5147、ラット由来ミエローマ210RC Y3-Ag.2.3.、ヒト由来ミエローマU-266AR1、GM1500-6TG-A1-2、UC729-6、CEM-AG R、DIR11あるいはCEM-T15を使用することができる。

【0096】

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンのスクリーニングは、ハイブリドーマを、例えばマイクロタイタープレート中で培養し、増殖の見られ

たウェルの培養上清の前述の免疫感作で用いた免疫抗原に対する反応性を、例えばRIAやELISA等の酵素免疫測定法によって測定することにより行なうことができる。

## 【0097】

ハイブリドーマからのモノクローナル抗体の製造は、ハイブリドーマをインビトロ、またはマウス、ラット、モルモット、ハムスターまたはウサギ等、好ましくはマウスまたはラット、より好ましくはマウスの腹水中等でのインビボで行い、得られた培養上清、または哺乳動物の腹水から単離することにより行うことができる。

## 【0098】

インビトロで培養する場合には、培養する細胞種の特性、試験研究の目的及び培養方法等の種々条件に合わせて、ハイブリドーマを増殖、維持及び保存させ、培養上清中にモノクローナル抗体を産生させるために用いられるような既知栄養培地あるいは既知の基本培地から誘導調製されるあらゆる栄養培地を用いて実施することが可能である。

## 【0099】

基本培地としては、例えば、Ham' F12培地、MCDB153培地あるいは低カルシウムMEM培地等の低カルシウム培地及びMCDB104培地、MEM培地、D-MEM培地、RPMI1640培地、ASF104培地あるいはRD培地等の高カルシウム培地等が挙げられ、該基本培地は、目的に応じて、例えば血清、ホルモン、サイトカイン及び／または種々無機あるいは有機物質等を含むことができる。

## 【0100】

モノクローナル抗体の単離、精製は、上述の培養上清あるいは腹水を、飽和硫酸アンモニウム、ユーグロブリン沈澱法、カプロイン酸法、カプリル酸法、イオン交換クロマトグラフィー（DEAEまたはDE52等）、抗イムノグロブリンカラムあるいはプロテインAカラム等のアフィニティカラムクロマトグラフィーに供すること等により行うことができる。

## 【0101】

「組換えキメラモノクローナル抗体」は、遺伝子工学的に作製されるモノクロ

ーナル抗体であって、具体的には、その可変領域が、非ヒト哺乳動物（マウス、ラット、ハムスターなど）のイムノグロブリン由来の可変領域であり、かつその定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であることを特徴とするマウス／ヒトキメラモノクローナル抗体等のキメラモノクローナル抗体を意味する。

【0102】

ヒトイムノグロブリン由来の定常領域は、IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4)、IgM、IgA、IgD及びIgE等のアイソタイプにより各々固有のアミノ酸配列を有するが、組換えキメラモノクローナル抗体の定常領域はいずれのアイソタイプに属するヒトイムノグロブリンの定常領域であってもよい。好ましくは、ヒトIgGの定常領域である。

【0103】

組換えキメラモノクローナル抗体は、例えば以下のようにして製造することができる。しかしながら、そのような製造方法に限定されるものでないことは言うまでもない。

【0104】

例えば、マウス／ヒトキメラモノクローナル抗体は、実験医学（臨時増刊号）、第1.6巻、第10号、1988年及び特公平3-73280号公報等を参照しながら作製することができる。即ち、マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから単離した該マウスモノクローナル抗体をコードするDNAから取得した活性なV<sub>H</sub>遺伝子（H鎖可変領域をコードする再配列されたVDJ遺伝子）の下流に、ヒトイムノグロムリンをコードするDNAから取得したCH遺伝子（H鎖定常領域をコードするC遺伝子）を、また該ハイブリドーマから単離したマウスモノクローナル抗体をコードするDNAから取得した活性なV<sub>L</sub>遺伝子（L鎖可変領域をコードする再配列されたVJ遺伝子）の下流にヒトイムノグロムリンをコードするDNAから取得したC<sub>L</sub>遺伝子（L鎖定常領域をコードするC遺伝子）を、各々発現可能なように配列して1つ又は別々の発現ベクターに挿入し、該発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、該形質転換細胞を培養することにより作製することができる。

【0105】

具体的には、まず、マウスモノクローナル抗体産生ハイブリドーマから常法によりDNAを抽出後、該DNAを適切な制限酵素（例えばEcoRI、Hind III等）を用いて消化し、電気泳動に付して（例えば0.7%アガロースゲル使用）サザンブロット法を行う。泳動したゲルを例えばエチジウムブロマイド等で染色し、写真撮影後、マーカの位置を付し、ゲルを2回水洗し、0.25MのHCl溶液に15分間浸す。次いで、0.4NのNaOH溶液に10分間浸し、その間緩やかに振盪する。常法により、フィルターに移し、4時間後フィルターを回収して2×SSCで2回洗浄する。フィルターを十分乾燥した後、ペイキング（75℃、3時間）を行う。ペイキング終了後に、該フィルターを0.1×SSC/0.1%SDS溶液に入れ、65℃で30分間処理する。次いで、3×SSC/0.1%SDS溶液に浸す。得られたフィルターをプレハイブリダイゼーション液と共にビニール袋に入れ、65℃で3～4時間処理する。

## 【0106】

次に、この中に<sup>32</sup>P標識したプローブDNA及びハイブリダイゼーション液を入れ、65℃で12時間程度反応させる。ハイブリダイゼーション終了後、適切な塩濃度、反応温度および時間（例えば、2×SSC/0.1%SDS溶液、室温、10分間）のもとで、フィルターを洗う。該フィルターをビニール袋に入れ、2×SSCを少量加え、密封し、オートラジオグラフィーを行う。

## 【0107】

上記サザンブロット法により、マウスモノクローナル抗体のH鎖及びL鎖を各々コードする再配列されたVDJ遺伝子及びVJ遺伝子を同定する。同定したDNA断片を含む領域をショ糖密度勾配遠心にて分画し、ファージベクター（例えば、Charon 4A、Charon 28、λEMBL3、λEMBL4等）に組み込み、該ファージベクターで大腸菌（例えば、LE392、NM539等）を形質転換し、ゲノムライブラリーを作製する。そのゲノムライブラリーを適当なプローブ（H鎖J遺伝子、L鎖（κ）J遺伝子等）を用いて、例えばペントンディビス法（Science、第196巻、第180～第182頁、1977年）に従って、プラークハイブリダイゼーションを行い、再配列されたVDJ遺伝子あるいはVJ遺伝子を各々含むポジティブクローンを得る。得られたクローンの制限酵素地図を作製し、塩基配列を決定し、目的とす

る再配列された  $V_H$  (VDJ) 遺伝子あるいは  $V_L$  (VJ) 遺伝子を含む遺伝子を得られていることを確認する。

## 【0108】

一方、キメラ化に用いるヒト  $C_H$  遺伝子及びヒト  $C_L$  遺伝子を別に単離する。例えば、ヒト IgG1 とのキメラ抗体を作製する場合には、 $C_H$  遺伝子である  $C\gamma 1$  遺伝子と  $C_L$  遺伝子である  $C\kappa$  遺伝子を単離する。これらの遺伝子はマウス免疫グロブリン遺伝子とヒト免疫グロブリン遺伝子の塩基配列の高い相同性を利用してヒト  $C\gamma 1$  遺伝子及びヒト  $C\kappa$  遺伝子に相当するマウス  $C\gamma 1$  遺伝子及びマウス  $C\kappa$  遺伝子をプローブとして用い、ヒトゲノムライブラリーから単離することによって得ることができる。

## 【0109】

具体的には、例えば、クローン Ig146 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第75巻、第4709～第4713頁、1978年) からの 3kb の Hind III-BamHI 断片と クローン MEP10 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第78巻、第474～第478頁、1981年) からの 6.8kb の EcoRI 断片をプローブとして用い、ヒトのラムダ Charon 4A の Hae III-Alu I ゲノムライブラリー (Cell、第15巻、第1157～第1174頁、1978年) 中から、ヒト  $C\kappa$  遺伝子を含み、エンハンサー領域を保持している DNA 断片を単離する。また、ヒト  $C\gamma 1$  遺伝子は、例えばヒト胎児肝細胞 DNA を Hind III で切断し、アガロースゲル電気泳動で分画した後、5.9kb のバンドを  $\lambda$  788 に挿入し、前記のプローブを用いて単離する。

## 【0110】

このようにして単離されたマウス  $V_H$  遺伝子とマウス  $V_L$  遺伝子、及びヒト  $C_H$  遺伝子とヒト  $C_L$  遺伝子を用いて、プロモーター領域及びエンハンサー領域などを考慮しながらマウス  $V_H$  遺伝子の下流にヒト  $C_H$  遺伝子を、またマウス  $V_L$  遺伝子の下流にヒト  $C_L$  遺伝子を、適切な制限酵素及び DNA リガーゼを用いて、例えば pSV2gpt あるいは pSV2ne 等の発現ベクターに常法に従って組み込む。この際、マウス  $V_H$  遺伝子/ヒト  $C_H$  遺伝子とマウス  $V_L$  遺伝子/ヒト  $C_L$  遺伝子のキメラ遺伝子は、一つの発現ベクターに同時に配置されてもよいし、各々別個の発現ベクターに配置することもできる。

## 【0111】

このようにして作製したキメラ遺伝子挿入発現ベクターを、例えばP3X63・Ag8・653細胞あるいは SP210細胞といった、自らは抗体を産生していない骨髓腫細胞にプロトプラスト融合法、DEAE-デキストラン法、リン酸カルシウム法あるいは電気穿孔法等により導入する。形質転換細胞は、発現ベクターに導入された薬物耐性遺伝子に対応する薬物含有培地中での培養により選別し、目的とするキメラモノクローナル抗体産生細胞を取得する。

このようにして選別された抗体産生細胞の培養上清中から目的のキメラモノクローナル抗体を取得する。

## 【0112】

「ヒト型モノクローナル抗体 (CDR-grafted抗体)」は、遺伝子工学的に作製されるモノクローナル抗体であって、具体的には、その超可変領域の相補性決定領域の一部または全部が非ヒト哺乳動物 (マウス、ラット、ハムスターなど) のモノクローナル抗体に由来する超可変領域の相補性決定領域であり、その可変領域の枠組領域がヒトイムノグロブリン由来の可変領域の枠組領域であり、かつその定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であることを特徴とするヒト型モノクローナル抗体を意味する。

## 【0113】

ここで、超可変領域の相補性決定領域とは、抗体の可変領域中の超可変領域に存在し、抗原と相補的に直接結合する部位である3つの領域 (Complementarity-determining residue; CDR1、CDR2、CDR3) を指し、また可変領域の枠組領域とは、該3つ相補性決定領域の前後に介在する比較的保存された4つの領域 (Framework region; FR1、FR2、FR3、FR4) を指す。

換言すれば、非ヒト哺乳動物由来のモノクローナル抗体の超可変領域の相補性決定領域の一部または全部以外の全ての領域が、ヒトイムノグロブリンの対応領域と置き代わったモノクローナル抗体を意味する。

## 【0114】

ヒトイムノグロブリン由来の定常領域は、IgG (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgM、IgA、IgD及びIgE等のアイソタイプにより各々固有のアミノ

酸配列を有するが、本発明においては、該ヒト型モノクローナル抗体の定常領域はいずれのアイソタイプに属するヒトイムノグロブリンの定常領域であってもよい。好ましくは、ヒトIgGの定常領域である。また、ヒトイムノグロブリン由来の可変領域の枠組領域についても限定されるものではない。

【0115】

ヒト型モノクローナル抗体は、例えば以下のようにして製造することができる。しかしながら、そのような製造方法に限定されるものでないことは言うまでもない。

例えば、マウスモノクローナル抗体に由来する組換ヒト型モノクローナル抗体は、特表平4-506458号公報及び特開昭62-296890号公報等を参照して、遺伝子工学的に作製することができる。即ち、マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから、少なくとも1つのマウスH鎖CDR遺伝子と該マウスH鎖CDR遺伝子に対応する少なくとも1つのマウスL鎖CDR遺伝子を単離し、またヒトイムノグロブリン遺伝子から前記マウスH鎖CDRに対応するヒトH鎖CDR以外の全領域をコードするヒトH鎖遺伝子と、前マウスL鎖CDRに対応するヒトL鎖CDR以外の全領域をコードするヒトL鎖遺伝子を単離する。

【0116】

単離した該マウスH鎖CDR遺伝子と該ヒトH鎖遺伝子を発現可能なように適当な発現ベクターに導入し、同様に該マウスL鎖CDR遺伝子と該ヒトL鎖遺伝子を発現可能なように適当なもう1つの発現ベクターに導入する。または、該マウスH鎖CDR遺伝子／ヒトH鎖遺伝子とマウスL鎖CDR遺伝子／ヒトL鎖遺伝子を同一の発現ベクターに発現可能なように導入することもできる。このようにして作製された発現ベクターで宿主細胞を形質転換することによりヒト型モノクローナル抗体産生形質転換細胞を得、該形質転換細胞を培養することにより培養上清中から目的のヒト型モノクローナル抗体を得る。

【0117】

「ヒトモノクローナル抗体」とは、イムノグロブリンを構成するH鎖の可変領域及びH鎖の定常領域並びにL鎖の可変領域及びL鎖の定常領域を含む全ての領域がヒトイムノグロブリンをコードする遺伝子に由来するイムノグロブリンであ



る。

ヒト抗体（好ましくはヒトモノクローナル抗体）は、常法に従って、例えば、少なくともヒトイムノグロブリン遺伝子をマウス等のヒト以外の哺乳動物の遺伝子座中に組込むことにより作製されたトランスジェニック動物を、抗原で免疫感作することにより、前述したポリクローナル抗体あるいはモノクローナル抗体の作製法と同様にして製造することができる。

【0118】

例えば、ヒト抗体を産生するトランスジェニックマウスは、Nature Genetics, Vol.7, p.13-21, 1994; Nature Genetics, Vol.15, p.146-156, 1997; 特表平4-504365号公報; 特表平7-509137号公報; 日経サイエンス、6月号、第40～第50頁、1995年; 国際出願公開W094/25585号公報; Nature, Vol.368, p.856-859, 1994; 及び特表平6-500233号公報などに記載の方法に従って作製することができる。

また、昨今開発された技術であるトランスジェニックなウシやブタのミルク中からヒト由来タンパクを製造方法を適用することも可能である（日系サイエンス、1997年4月号、第78頁乃至84頁）。

【0119】

本発明における「抗体の一部」とは、前述のようなモノクローナル抗体の一部の領域を意味し、具体的には $F(ab')_2$ 、 $Fab'$ 、 $Fab$ 、 $Fv$  (variable fragment of antibody)、 $sFv$ 、 $dsFv$  (disulphide stabilised  $Fv$ ) あるいは $dAb$  (single domain antibody) などを意味する (Exp. Opin. Ther. Patents, 第6巻, 第5号, 第441～456頁, 1996年)。

ここで、「 $F(ab')_2$ 」及び「 $Fab'$ 」とは、イムノグロブリン（モノクローナル抗体）を、蛋白分解酵素であるペプシンあるいはパパイン等で処理することにより製造され、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の前後で消化されて生成される抗体フラグメントを意味する。例えば、 $IgG$ をパパインで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の上流で切断されて $V_L$ （L鎖可変領域）と $C_L$ （L鎖定常領域）からなるL鎖、及び $V_H$ （H鎖可変領域）と $C_H\gamma 1$ （H鎖定常領域中の $\gamma 1$ 領域）とからなるH鎖フラグ

メントがC末端領域でジスルフィド結合により結合した相同な2つの抗体フラグメントを製造することができる。これら2つの相同な抗体フラグメントを各々Fab'という。またIgGをペプシンで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の下流で切断されて前記2つのFab'がヒンジ領域でつながったものよりやや大きい抗体フラグメントを製造することができる。この抗体フラグメントをF(ab')<sub>2</sub>という。

## 【0120】

本発明の「医薬組成物」とは、前記で定義される「物質」、具体的には「AILIMに結合しAILIM発現細胞の増殖を抑制するか、またはAILIMに結合しAILIM発現細胞によるインターフェロン $\gamma$ 若しくはインターロイキン4の産生を抑制する活性を有する物質」並びに薬学的に許容され得る担体とを含んでなる医薬組成物である。具体的には、前記で定義した「蛋白性物質」若しくは「非蛋白性物質」、並びに薬学的に許容され得る担体を含んでなる医薬組成物である。さらに具体的には、前記に定義したポリペプチド、該ポリペプチドの一部（断片）、融合ポリペプチド、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体若しくは該モノクローナル抗体の一部のいずれかと薬学的に許容され得る担体を含んでなる医薬組成物である。

## 【0121】

ここで「薬学的に許容され得る担体」とは、賦形剤、希釈剤、増量剤、崩壊剤、安定剤、保存剤、緩衝剤、乳化剤、芳香剤、着色剤、甘味剤、粘稠剤、矯味剤、溶解補助剤あるいはその他の添加剤等が挙げられる。そのような担体の一つ以上を用いることにより、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、注射剤、液剤、カプセル剤、トロー剤、エリキシル剤、懸濁剤、乳剤あるいはシロップ剤等の形態の医薬組成物を調製することができる。

これらの医薬組成物は、経口あるいは非経口的に投与することができる。非経口投与のためのその他の形態としては、一つまたはそれ以上の活性物質を含み、常法により処方される外用液剤、腸溶内投与のための坐剤およびベッサリーなどが含まれる。

## 【0122】

投与量は、患者の年齢、性別、体重及び症状、治療効果、投与方法、処理時間、あるいは該医薬組成物に含有される活性成分（前記ポリペプチドや抗体など）の種類などにより異なるが、通常成人一人当たり、一回につき $10\mu\text{g}$ から $1000\text{mg}$ （あるいは $10\mu\text{g}$ から $500\text{mg}$ ）の範囲で投与することができる。しかしながら、投与量は種々の条件により変動するため、上記投与量より少ない量で十分な場合もあり、また上記の範囲を越える投与量が必要な場合もある。

## 【0123】

とりわけ注射剤の場合には、例えば生理食塩水あるいは市販の注射用蒸留水等の非毒性の薬学的に許容され得る担体中に $0.1\mu\text{g}$ 抗体/ $\text{ml}$ 担体 $\sim 10\text{mg}$ 抗体/ $\text{ml}$ 担体の濃度となるように溶解または懸濁することにより製造することができる。このようにして製造された注射剤は、処置を必要とするヒト患者に対し、1回の投与において $1\text{kg}$ 体重あたり、 $1\mu\text{g}\sim 100\text{mg}$ の割合で、好ましくは $50\mu\text{g}\sim 50\text{mg}$ の割合で、1日あたり1回 $\sim$ 数回投与することができる。投与の形態としては、静脈内注射、皮下注射、皮内注射、筋肉内注射あるいは腹腔内注射のような医療上適当な投与形態が例示できる。好ましくは静脈内注射である。

## 【0124】

また、注射剤は、場合により、非水性の希釈剤（例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類など）、懸濁剤あるいは乳濁剤として調製することもできる。

## 【0125】

そのような注射剤の無菌化は、バクテリア保留フィルターを通す濾過滅菌、殺菌剤の配合または照射により行うことができる。注射剤は、用時調製の形態として製造することができる。即ち、凍結乾燥法などによって無菌の固体組成物とし、使用前に無菌の注射用蒸留水または他の溶媒に溶解して使用することができる。

## 【0126】

本発明の医薬組成物は、T細胞等のリンパ球の活性化並びに活性化リンパ球の機能制御の異常に起因する種々の自己免疫性疾患、アレルギー性疾患または炎症性疾患の治療及び予防に有用である。

該疾患としては例えば、関節症（例えば、関節リウマチ、変形性関節症など）、炎症（例えば、脳炎、気管支炎、血管炎、肺炎、肝炎、心筋炎、脾炎、腸炎、胃炎、腹膜炎、腎炎（糸球体腎炎など）、関節炎（関節リウマチなど）、虚血後再灌流障害（心筋虚血再灌流障害など）における炎症、移植後免疫拒絶に起因する炎症、火傷、多発性臓器障害における炎症、PTCAやPTCRの術後における炎症、及び動脈硬化症に伴う炎症など）、移植片対宿主反応、移植片対宿主反応、外来抗原による免疫感作により惹起される該抗原に対する抗体の過剰産生を伴う種々の疾患、多発性硬化症、自己免疫性甲状腺炎、アレルギー性接触性皮膚炎、慢性炎症性皮膚疾患である扁平苔癬、全身性エリテマトーデス、インスリン依存性糖尿病及び乾癬などが挙げられる。

【0127】

本発明における「炎症」には、急性炎症及び慢性炎症のいずれもが包含される。

一般に急性炎症とは、炎症反応が比較的急速に発現し進行が速く、その終了が明確な炎症である。一方、慢性炎症とは、炎症反応が比較的ゆっくりあるいは徐々に発現し、あるいはその発現の存在した不明確な程度に発現し、数週間乃至数年間にわたり持続され、その終了も不明確な炎症である。

また、本発明における炎症には、任意の組織で起こる炎症もが包含される。具体的には、脳、眼、気管、血管、肺、肝臓、心臓、脾臓、胃、腸、腸間膜、腎臓、皮膚、鼻粘膜あるいは関節などの組織における炎症が含まれる。

本発明の医薬組成物の種々疾患症状の治療効果については、常法に従って、既知の疾患モデル動物に投与することにより試験、検討することができる。

【0128】

以下、実施例を以て本発明をさらに詳細に説明するが、本発明が該実施例に記載される態様のみに限定されるものではないことは言うまでもない。

【0129】

実施例1 実験材料の準備

以下に述べる試験で用いた実験材料（動物、抗体、細胞）は特に断りのない限り以下のようにして調製した。

## 【 0 1 3 0 】

## &lt; 1 - 1 &gt; 動物

C57BL/6マウス（雄、5乃至8週齢）及びBALB/cマウス（雄、5乃至8週齢）は、日本SLC（株）より購入した。Wistarラット（雄、5乃至6週齢）は、日本チャールズリバー（株）より購入した。

## 【 0 1 3 1 】

## &lt; 1 - 2 &gt; 抗ラットAILIMモノクローナル抗体の調製

以前本発明者が作成し報告したマウス抗ラットAILIMモノクローナル抗体（マウス抗ラットJTT-1抗原モノクローナル抗体）を産生する「JTT-1」及び「JTT-2」と各々命名したハイブリドーマ（2つのハイブリドーマは1996年10月11日付でブダペスト条約の下で認定された国際寄託機関である日本国通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に国際寄託されている。<JTT-1>国際寄託番号FERM BP-5707、及び<JTT-2>国際寄託番号FERM BP-5708）をin vitroまたはin vivoで培養して得られる培養上清または腹水から精製したモノクローナル抗体を以下の試験で用いた（日本国特許出願公開11-29599号公報（実施例1及び2）、及び国際特許出願公開W098/38216号（実施例1及び2））。

以下、これらのマウス抗ラットAILIMモノクローナル抗体を、各々「JTT-1抗体」及び「JTT-2抗体」（IgG1）と呼ぶ。

なお、以下の試験で用いられる抗ラットAILIM抗体は特に断りのなかりかぎり「JTT-2抗体」（IgG1）である。

## 【 0 1 3 2 】

## &lt; 1 - 3 &gt; 抗ヒトAILIMモノクローナル抗体の調製

以前本発明者が作成し報告したマウス抗ヒトAILIMモノクローナル抗体（マウス抗ヒトJTT-1抗原モノクローナル抗体）を産生する「SA12」と命名したハイブリドーマ（ $10^6$ 乃至 $10^7$ 個/0.5ml/マウス）を、ICR nu/nuマウス（雌、7乃至8週齢）の腹腔内に注射した。10乃至20日後、マウスを麻酔下で開腹し、常法に従って採取した腹水からマウス抗ヒトAILIMモノクローナル抗体を大量調製した（日本国特許出願公開11-29599号公報（実施例12）、及び国際特許出願公開W098/38216号（実施例12））。

以下、このマウス抗ヒトAILIMモノクローナル抗体を「SA12抗体」(IgG1)と呼び、以下の試験で用いた

【0133】

<1-4> 抗マウスAILIMモノクローナル抗体の調製

以下のようにして調製した。

以前本発明者らがクローニングしたマウスAILIM (マウスJTT-1抗原) (日本国特許出願公開11-29599号公報 (配列番号5)、及び国際特許出願公開W098/38216号 (配列番号5)) の全長アミノ酸配列をコードするcDNAを用いて、遺伝子組換え技術を用いて常法に従ってマウスAILIMを発現する形質転換細胞を調製した。

該形質転換細胞をホモジナイズし、超遠心分離 (100,000×g) して、細胞膜画分を含む遠心残さを回収し、PBSに懸濁させた。得られた細胞膜画分を、完全フロインドアジュバントとともにWistarラットのフットパッド内に注射することにより初回免疫 (0日) した。さらに該細胞膜画分抗原を7日目、14日目および28日目という間隔でフットパッド内に投与した。最後の免疫から2日後にリンパ節細胞を採取した。

【0134】

該リンパ節細胞とマウスミエローマ細胞PAI (JCR No.B0113; Res. Disclosure, Vol.217, p.155, 1982) とを5:1で混合し、融合剤としてポリエチレングリコール4000 (Boehringer Mannheim製) を用いて細胞融合させることによりモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマの選択は、10% ウシ胎児血清とアミノプテリンを含有するHAT含有ASF104培地 (味の素製) 中で培養することにより行った。

【0135】

各々のハイブリドーマの培養上清中に生成されたモノクローナル抗体のマウスAILIM (マウスJTT-1抗原) に対する反応性を、各々の培養上清を、前記組換えマウスAILIM発現形質転換細胞に反応させた後、FITC標識抗ラットIgG (Cappel製) と反応させることにより染色された細胞の蛍光強度をEPICS-ELITEフローサトメーターで測定することにより確認した。この結果、マウスAILIM (マウスJTT-1抗原) に反応性を有するモノクローナル抗体を産生する複数のハイブリドーマを得

た。

それらのハイブリドーマの内の1つを「B10.5」と命名した。このハイブリドーマ ( $10^6$ 乃至 $10^7$ 個/0.5ml/マウス) を、ICR nu/nuマウス (雌、7乃至8週齢) の腹腔内に注射した。10乃至20日後、マウスを麻酔下で開腹し、常法に従って採取した腹水からラット抗マウスAILIMモノクローナル抗体を大量調製した。以下、このハイブリドーマB10.5が産生するラット抗マウスAILIMモノクローナル抗体を「B10.5抗体」(IgG1) と呼び、以下の試験で用いた。

#### 【0136】

##### <1-5> リンパ球の調製

マウスを断頭致死させた後、常法に従って胸腺及び末梢リンパ組織 (脾臓、リンパ節) を各々採取し、ステンレス製メッシュ上で細切した。得られた細切組織を10%FCS (ウシ胎児血清) を含有するRPMI1640培地に懸濁させ細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液 (各々 $1 \times 10^7$ 乃至 $3 \times 10^7$ /ml) をシャーレに播種しCO<sub>2</sub>インキュベーター内で2時間培養した。培養後、シャーレから注意深く非粘着性細胞を回収し、RPMI1640培地で洗浄した、細胞懸濁液を取得した。

ラットの胸腺及び末梢リンパ組織 (脾臓、リンパ節) も、前記と同様にして取得した。

ヒトの末梢血T細胞は、定法に従い、ヒトのヘパリン採血液をリンホブレップ (Nycomed製) で分離して単核球を取得した後、Pan T cell磁気分離カラムを用いて回収した。

#### 【0137】

##### <1-6> 株化T細胞の調製

各種T細胞株 (D10、MS202、CD28K0、EL-4、2L2、BC3C13) を安倍博士 (東京理科大学) より譲り受け、以下の試験において用いた。

#### 【0138】

##### 実施例2 各種組織及び細胞でのAILIMの発現状態

——動物 (マウス、ラットまたはヒト) の正常組織及び病変組織でのAILIMの発現状態の差違、未刺激T細胞及び活性化T細胞でのAILIMの発現状態の差違、並びに各種T細胞株でのAILIMの発現状態の差違を常法に従って細胞染色及びフロー

サイトメトリー (flow cytometry) によって解析した。

下記試験で得られた結果を基に、AILIMの組織及び細胞での発現パターンを、CD28の発現のパターンと比較しながら、模式的に示した (図23)

【0139】

<2-1> 細胞染色及びフローサイトメトリー (flow cytometry)

細胞染色及びフローサイトメーター (flow cytometer) による解析は特に断りの無い限り下記のようにして行った。

上記のように取得したリンパ球細胞懸濁液、またはT細胞刺激物質 (抗CD3抗体、ConA、またはPMAとionophoreなど) で刺激した後のT細胞若しくは各種T細胞株を、定法に従って染色し、染色された細胞の蛍光強度をFACSort (Becton Dickinson製) を用いて測定し、LysisII解析ソフトを用いて解析した。

当該染色においては、一次抗体としては、前記で調製したマウス抗ラットAILIMモノクローナル抗体及びラット抗マウスAILIMモノクローナル抗体の各々をビオチン標識キットを用いて常法により標識したビオチン標識モノクローナル抗体を用いた。二次抗体としては、常法に従ってFITCまたはPE (ピコエリスリン) で標識した標識抗マウスIg抗体、標識抗ラットIg抗体、PE標識アビジン、またはFITC標識アビジンを用いた。

【0140】

<2-2> 正常リンパ組織内のT細胞でのAILIMの発現状態

マウスの正常リンパ組織である胸腺のT細胞においては、AILIMの発現はCD3の発現の増加に伴い増加した (図1(a))。一方、対照的に、コストимуレトリー分子であるCD28の発現はCD3の発現の減少に伴い減少した (図1(b))。正常胸腺T細胞においては、AILIMの発現とCD28の発現は相反する動態を示した。

また、正常胸腺細胞においては、リンパ球のポジティブセレクションが達成されるSP細胞 ( $CD4^{+}CD8^{-}$ 細胞及び $CD4^{-}CD8^{+}$ 細胞) で高い発現が認められた (図2)。

【0141】

<2-3> 末梢リンパ組織内のT細胞でのAILIMの発現状態

マウスの正常リンパ組織である脾臓のT細胞では、CD4陽性T細胞の極少数 (CD



4陽性T細胞の約1乃至3%)においてAILIMの発現が認められた(図3)。また、正常リンパ節でも同様であった。

【0142】

<2-4> 肝炎モデル動物の病変組織浸潤T細胞でのAILIMの発現状態

肝炎モデルマウスを下記のように作製した。

C57BL/6マウスにP.acnes (Propionibacterium acnes) のリン酸緩衝液 (PBS) 溶液を静注した。1週間後、該マウスにLPS (Lipopolysaccharide) のPBS溶液を静注することにより肝炎を誘導し、肝炎モデル動物として用いた。

当該肝炎モデルマウスの肝臓組織浸潤CD4陽性T細胞(単核細胞)においては、AILIMの顕著な発現が認められた(図4)。その発現は正常マウス脾臓由来のCD4陽性細胞でのAILIMの発現に比べ著しいものであった(図3)。

【0143】

<2-5> 関節リウマチ患者の病変部位浸潤T細胞でのAILIMの発現状態

関節リウマチ患者の関節滑液中の関節組織浸潤T細胞においては、同患者の末梢血中のT細胞及び健常人の末梢血中のT細胞のいずれに比べても、有意に高いAILIMの発現が認められた(図5)。

【0144】

<2-6> 活性化T細胞でのAILIMの発現状態

マウスの末梢リンパ組織由来のT細胞においては、抗CD3抗体、コンカナバリンA (Concanavalin A; ConA)、またはPMA (phorbol myristate acetate) とIonophoreで刺激すると約3乃至6時間後にAILIMの発現の上昇が認められ、刺激から約24時間以降でAILIMの高い発現が認められた(図6)。また、その発現は、約48時間後でも同程度の発現が維持された。

【0145】

<2-7> 各種T細胞株でのAILIMの発現状態

AILIMは、Th2タイプのサイトカイン産生の性状を有する株化T細胞(D10, MS202, CD28K0, EL-4など)でコンステイテューティブ(constitutive)な発現が認められた(図7)。また、それらの細胞株でのAILIMの発現は、CD28の発現と同等またはそれ以上に高い発現であった(図7)。

【0146】

## 実施例3 抗AILIM抗体によるT細胞反応の制御能の有無の検討

本発明の一部を構成する抗AILIM抗体が、T細胞反応（IFN- $\gamma$ やIL-4などのサイトカインの産生、及び細胞増殖など）を制御（促進及び／または抑制）する能力を有するか否か、即ちAILIMを介したコスティミュレイトリーシグナル（co-stimulatory signal）の細胞内への伝達の制御能を有するか否かを、該細胞からのサイトカイン（IFN- $\gamma$ 及びIL-4）の産生量、並びに該細胞の増殖の程度を指標に解析した。

【0147】

## &lt;3-1&gt; 試験方法

試験の目的に応じて、前述で準備した1または2種類の抗体（抗CD3抗体のみ、抗CD3抗体と抗AILIM抗体、または抗CD3抗体と抗CD28抗体）を96穴マイクロプレートに加え、37℃で1時間以上反応させて、該プレートを1または2の該抗体でコーティングした。プレートをPBSで十分に洗浄した後、前記で調製した胸腺細胞（ $5 \times 10^5$ 個/well）、脾臓細胞（ $2 \times 10^5$ 個/well）または精製T細胞（ $1 \times 10^5$ 乃至 $3 \times 10^5$ 個/well）を播種した。抗AILIM抗体または抗CD28抗体を、プレートへのコーティングの代わりに、後に添加する試験においては、該抗AILIM抗体または抗CD28抗体は、プレートへの細胞の播種の後に添加した。

プレートをCO<sub>2</sub>インキュベーター中で2乃至4日間培養し、培養上清中のサイトカイン（IFN- $\gamma$ またはIL-4）の濃度を常法に従ってELISAで測定した。また、細胞増殖の程度は、常法に従ってトリチウム標識チミジン（<sup>3</sup>H-TdR）取込試験（培養最後の2乃至4時間）により評価した。

【0148】

## &lt;3-2&gt; CD3とAILIMのクロスリンクによるT細胞内へのコスティミュレイトリーシグナルの伝達

哺乳動物（マウス、ラット及びヒト）の正常脾臓、胸腺及び末梢血の各々から単離したT細胞を、抗AILIM抗体及び抗CD3抗体の両方をコーティングしたプレート中で培養すると、当該T細胞からのサイトカインの産生及び細胞増殖が、抗AILIM抗体または抗CD3抗体の濃度に依存して促進された（図8、図9、及び図10）

。なお、本試験で用いた抗ラットAILIM抗体は、JTT-1抗体である。

【0149】

また、ConAまたはPMAで刺激した末梢血由来T細胞を、抗AILIM抗体及び抗CD3抗体の両方をコーティングしたプレート中で培養すると、当該T細胞からのサイトカインの産生及び細胞増殖が促進された。また、この結果は、ConAまたはPMAで刺激した末梢血由来T細胞を、抗CD28抗体及び抗CD3抗体の両方をコーティングしたプレート中で培養した場合の結果と同等であった。

この結果は、プレートにコーティングした抗CD3抗体が抗原提示細胞上のMHCとして働き、同コーティングした抗AILIM抗体がAILIMのリガンドとして働き、結果として、加えたT細胞の細胞内に、T細胞の活性化に必要な第1のシグナルと副刺激シグナル（コスティミュレイトリーシグナル）が伝達されたことを示している。

【0150】

<3-3> CD3を介したシグナルにより誘導されたT細胞反応の抗AILIM抗体による抑制

正常脾臓及び胸腺の各々から単離した胸腺細胞及び脾臓細胞（各々粘着性細胞を除去）を抗CD3抗体をコーティングしたプレート中で培養することによりT細胞反応を惹起したT細胞に、抗AILIM抗体を添加すると、該T細胞からのサイトカイン（インターフェロン $\gamma$ （IFN- $\gamma$ ）、インターロイキン4（IL-4）など）の産生が抑制されるとともに、該T細胞の増殖が抑制された（図11、図12、図13、及び図14）。

また、該抗AILIM抗体によるT細胞反応（前記サイトカイン産生、細胞増殖など）の抑制は、抗体の濃度に依存するものであった。一方、抗AILIM抗体の代わりに抗CD28抗体を加える場合には、抗AILIM抗体を用いた場合の結果をは逆に該T細胞反応が増強された（図11、図12、図13、及び図14）。

また、抗AILIM抗体の代わりにCTLA4-Ig（CTLA4の可溶性領域とIgFcとからなる融合蛋白）を加えた場合にも、T細胞反応の顕著な抑制効果は見られなかった。

【0151】

#### 実施例4 抗AILIM抗体による関節症の治療効果

Wistarラット（雄、5週齢、チャールズリバー製）に、流動パラフィンで10mg/mlに調製した結核死菌（*M. Tuberculosis* H37Ra; Difco）をアジュバントとして用い、0.1ml/匹の濃度で尾根部に皮内投与し（1mg/0.1ml/匹）関節症を誘導した。アジュバント投与日（0日）から7日後に両後肢足容積をプレシズモメーターで測定し、両後肢足容積を指標に群分けした（各群8匹）。

アジュバント投与日（0日）から7日後に、その内の1群に抗ラットAILIM抗体（JTT-2抗体、20mg/kg）を静注した。該抗体は、初回投与の後は1週間に2回の割合で初回投与から20日目まで投与した。アジュバント投与から経時的に両後肢足容積をプレシズモメーターで測定した。

なお、アジュバント及び抗体のいずれも投与しない正常ラット群（4匹）、及び抗ラットAILIM抗体の代わりにマウス抗ヒトCETP抗体（ネガティブコントロール）を同様にして投与した群を対照とし、同様にしてプレシズモメーターで両後肢足容積を測定した。

驚くべきことに、抗AILIM抗体を投与群では、足腫れが全く起こらず、関節炎を誘導していない正常ラット群とほぼ同じ結果であった（図15）。

【0152】

#### 実施例5 抗AILIM抗体による肝炎の治療効果

C57BL/6マウスに、*P. acnes* (*Propionibacterium acnes*) のリン酸緩衝液（PBS）溶液を静注した。*P. acnes*投与（0日）から1、2及び3日目に抗マウスAILIMモノクローナル抗体（B10.5抗体；5, 50, 500  $\mu$ g/匹）腹腔内投与し肝炎を誘導した。*P. acnes*投与（0日）から1週間後、該マウスにLPS（Lipopolysaccharide）のPBS溶液を静注した。1週間後に、LPSのPBS溶液を同様に静注した。LPS投与の6.5時間後に眼底より採血し、血漿中のIFN- $\gamma$ の濃度をELISAにより測定した。また、血漿中のGPT（glutamic-oxaloacetic transaminase）及びGOT（glutamic-pyruvic transaminase）の濃度を生化学検査装置（Fara）で測定した。

なお、抗マウスAILIM抗体を投与しない群を対照とした。

抗AILIM抗体の投与により、抗体濃度依存的に血中のIFN- $\gamma$ の上昇が有意に抑制されるとともに、GOT及びGPTの上昇が有意に抑制された（図16及び図17）。

## 【 0 1 5 3 】

## 実施例 6 抗AILIM抗体による移植片対宿主病 (GVHD) の治療効果

BALB/cマウスとC57BL/6マウスを交配して得たF1マウス (8乃至10週齢、3匹) に、BALB/cマウスの脾臓細胞 ( $8 \times 10^7$  個/匹) を静注しGVHDを誘導した。該脾臓細胞投与直後 (0時間) 及び12時間後の各々に抗マウスAILIMモノクローナル抗体 (B10.5抗体;  $400 \mu\text{g}$ /匹) を静注し、該脾臓細胞投与の24及び48時間後の各々に同B10.5抗体 ( $200 \mu\text{g}$ /匹) を腹腔内投与した。

該脾臓細胞投与直後 (0日)、1、2、3及び6週間後の各々に採血し、血清中のIgG1、IgE及び抗dsDNA抗体価を常法により測定した。なお、抗dsDNA抗体価の単位は、自己免疫疾患自然発症マウスの血清中の抗dsDNA抗体をスタンダードとして標準化した。

また、抗AILIM抗体の代わりに、hCTLA4-Ig (ヒトCTLA4の可溶性領域と免疫グロブリンの定常領域とからなる融合蛋白) を同様にして投与した群を陽性対照とした。また、抗AILIM抗体の代わりにPBSを同様にして投与した群を陰性対照とした。

抗AILIM抗体を投与した群では、陰性対照群に比べ、GVH反応 (graft versus host reaction) の指標である血清中のIgGの上昇、IgEの上昇、及び抗dsDNA抗体価の上昇が有意に抑制された。また、その抑制の効果は、hCTLA4-Igを投与した陽性対照群の値とほぼ同等であった (図18、図19、及び図20)。

## 【 0 1 5 4 】

## 実施例 7 抗AILIM抗体による抗外来抗原抗体産生の抑制効果

BALB/cマウス (雌、5週齢) に、羊赤血球 (SRBC; Sheep red blood cell;  $1 \times 10^8$  個/匹) を静注した。SRBC投与 (0日) の直後またはSRBC投与から7日後に抗マウスAILIMモノクローナル抗体 (B10.5抗体; 50または $500 \mu\text{g}$ /匹) を静注した。SRBC投与から経時的に採血し血清中の抗SRBC抗体の産生量を常法に従って測定した。

なお、抗AILIM抗体の代わりに、hCTLA4-Ig (ヒトCTLA4の可溶性領域と免疫グロブリンの定常領域とからなる融合蛋白) を同様にして投与した群を陽性対照とした。また、抗AILIM抗体の代わりにPBSを同様にして投与した群を陰性対照とし

た。

抗AILIM抗体を投与した群では、該抗体をSRBCによる感作直後投与した群においてもまた7日後に投与した群においても、陰性対照群に比べ、外来抗原としてのSRBCに特異的なIgG抗体の産生が有意に抑制された。また、その抑制の効果は、hCTLA4-Igを投与した陽性対照群の値よりも高いものであった。

一方、hCTLA4-Igを投与した群では、該hCTLA4-IgをSRBCによる感作直後に投与した群では、陰性対照に比べ抗SRBC抗体の産生が有意に抑制されたものの、SRBC感作から7日後の投与では有意な抑制は見られなかった。(図21、及び図22)。

【0155】

#### 【発明の効果】

本発明の医薬組成物は、T細胞等のリンパ球の活性化並びに活性化リンパ球の機能制御の異常に起因する下記に挙げるような種々の自己免疫性疾患、アレルギー性疾患または炎症性疾患の治療及び予防に有用である。

該疾患としては例えば、関節症(例えば、関節リウマチ、変形性関節症など)、炎症(例えば、脳炎、気管支炎、血管炎、肺炎、肝炎、心筋炎、脾炎、腸炎、胃炎、腹膜炎、腎炎(糸球体腎炎など)、関節炎(関節リウマチなど)、虚血後再灌流障害(心筋虚血再灌流障害など)における炎症、移植後免疫拒絶に起因する炎症、火傷、多発性臓器障害における炎症、PTCAやPTCRの術後における炎症、及び動脈硬化症に伴う炎症など)、移植片対宿主反応、移植片対宿主反応、外来抗原による免疫感作により惹起される該抗原に対する抗体の過剰産生を伴う種々の疾患、多発性硬化症、自己免疫性甲状腺炎、アレルギー性接触性皮膚炎、慢性炎症性皮膚疾患である扁平苔癬、全身性エリテマトーデス、インスリン依存性糖尿病及び乾癬などが挙げられる。

また、本発明の医薬組成物に含まれるAILIMに対するヒト抗体を含んでなる医薬組成物は、マウス由来の抗体をヒトに投与する際のアレルギー等の副作用を全く惹起しないことから医薬品として極めて有用である。

【0156】

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】

正常胸腺T細胞におけるCD3、CD28及びAILIMの発現状態を示す図。

分図 (a) はCD3及びAILIMの発現状態を示す。分図 (b) はCD3及びCD28の発現状態を示す。

【図 2】

正常胸腺T細胞でのCD28及びAILIMの発現状態を、CD4及びCD8の発現を指標としたT細胞の分化の各段階毎に示す図。

【図 3】

正常マウス脾臓組織に含まれるCD4陽性T細胞におけるAILIMの発現状態を示す図。

【図 4】

肝炎を罹患した宿主の肝臓組織浸潤CD4陽性T細胞におけるAILIMの発現状態を示す図。

【図 5】

正常末梢血中T細胞及び関節リウマチ患者の関節腔浸潤T細胞の各々に含まれるCD4陽性T細胞及びCD4陰性T細胞の各々におけるAILIM及びCD28の発現状態を示す図。

【図 6】

種々の刺激剤で刺激してT細胞反応を誘導した末梢T細胞における、抗AILIM抗体によるT細胞活性化の状態を経時的に示す図。

【図 7】

マウスの各種T細胞株及びT細胞由来ハイブリドーマでのAILIMの発現状態並びに他の種々の性状を概略的に示す図。

【図 8】

抗CD3抗体と抗AILIM抗体をコーティングしたプレートを用いた試験における、マウスT細胞のCD3とAILIMのクロスリンクの再現による、抗AILIM抗体によるT細胞活性化能（補助刺激惹起能）を示す図。

【図 9】

抗CD3抗体と抗AILIM抗体をコーティングしたプレートを用いた試験における、ラットT細胞のCD3とAILIMのクロスリンクの再現による、抗AILIM抗体によるT

細胞活性化能（補助刺激惹起能）を示す図。

【図 1 0】

抗CD3抗体と抗AILIM抗体をコーティングしたプレートを用いた試験における、ヒトT細胞のCD3とAILIMのクロスリンクの再現による、抗AILIM抗体によるT細胞活性化能（補助刺激惹起能）を示す図。

【図 1 1】

抗CD3抗体による刺激によりT細胞反応を惹起したT細胞における、T細胞反応の1つであるIFN- $\gamma$ の産生の上昇に対する抗AILIM抗体による抑制効果を示す図。

【図 1 2】

抗CD3抗体による刺激によりT細胞反応を惹起したT細胞における、T細胞反応の1つであるIL-4の産生の上昇に対する抗AILIM抗体による抑制効果を示す図。

【図 1 3】

抗CD3抗体による刺激によりT細胞反応を惹起した胸腺細胞における、T細胞反応の1つであるIL-4の産生の上昇に対する抗AILIM抗体による抑制効果を示す図。

【図 1 4】

抗CD3抗体による刺激によりT細胞反応を惹起した脾臓細胞における、T細胞反応の1つであるIL-4の産生の上昇に対する抗AILIM抗体による抑制効果を示す図。

【図 1 5】

関節リウマチを罹患している宿主における足腫れの進行に対する抗AILIM抗体による抑制効果を示す図。

【図 1 6】

肝炎宿主における病状悪化のパラメーターであるIFN- $\gamma$ の産生の上昇に対する抗AILIM抗体による抑制効果を示す図。

【図 1 7】

肝炎宿主における病状悪化のパラメーターであるGPT及びGOTの産生の上昇対



する抗AILIM抗体による抑制効果を示す図。

【図 1 8】

移植片対宿主病 (GVHD) の移植変対宿主反応 (GVH反応) の 1 つである IgG の産生の上昇に対する抗AILIM抗体による抑制効果を示す図。

【図 1 9】

移植片対宿主病 (GVHD) の移植変対宿主反応 (GVH反応) の 1 つである IgE の産生の上昇に対する抗AILIM抗体による抑制効果を示す図。

【図 2 0】

移植片対宿主病 (GVHD) の移植変対宿主反応 (GVH反応) の 1 つである抗dsDNA抗体価の上昇に対する抗AILIM抗体による抑制効果を示す図。

【図 2 1】

外来抗原で免疫感作された宿主の生体での該外来抗原に対する抗体の産生の抗AILIM抗体 (抗原感作直後に投与) による抑制効果を示す図。

【図 2 2】

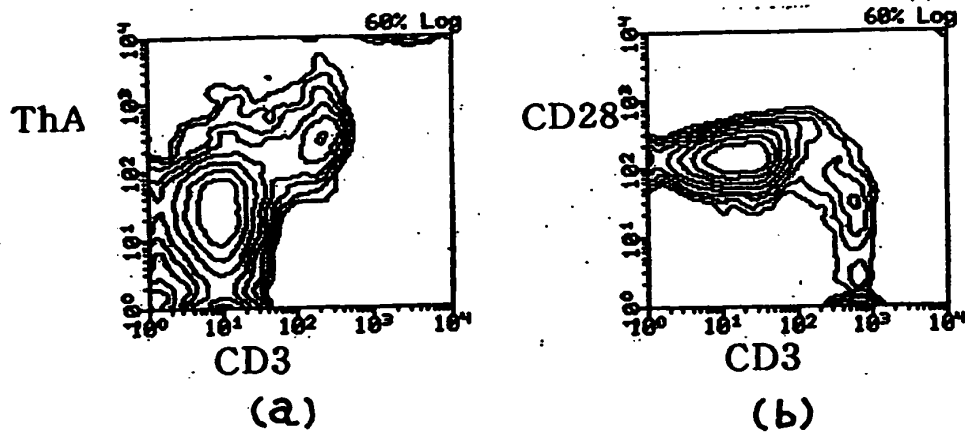
外来抗原で免疫感作された宿主の生体での該外来抗原に対する抗体の産生の抗AILIM抗体 (抗原感作 7 日目に投与) による抑制効果を示す図。

【図 2 3】

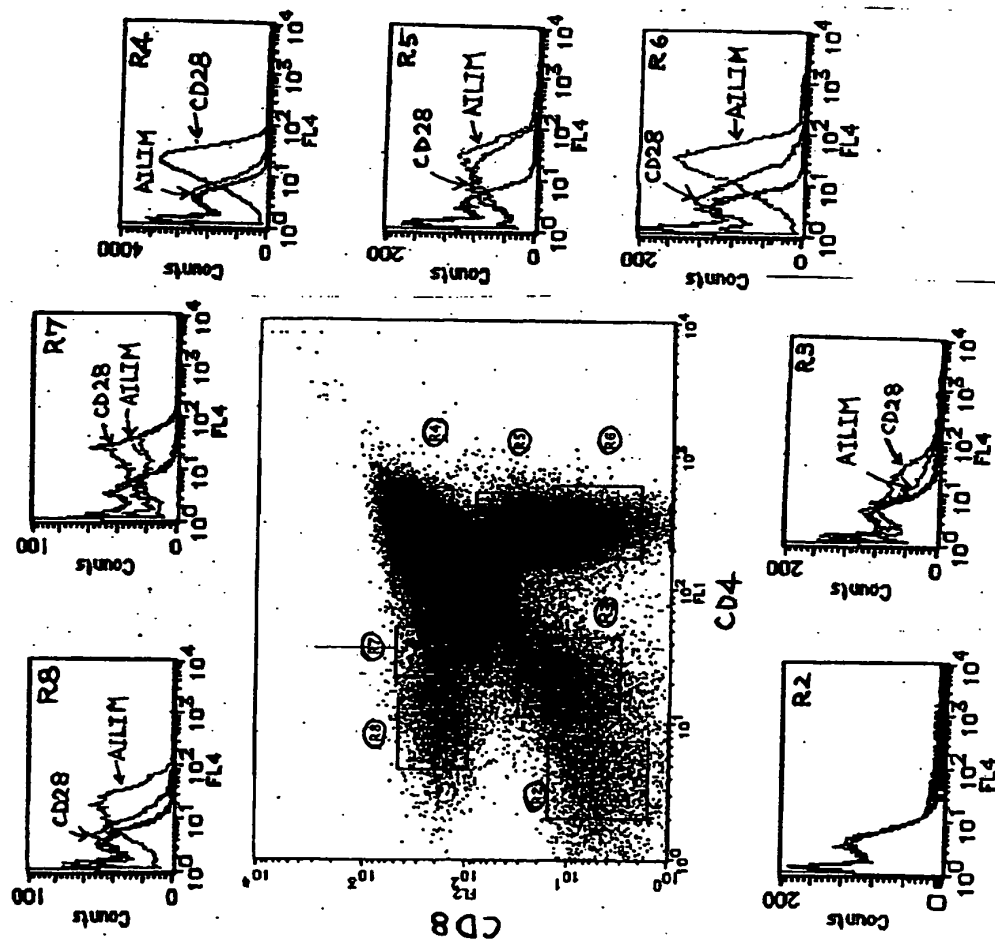
正常組織 (胸腺、リンパ節及び末梢血) 並びに病変部位でのAILIMの発現状態、並びにCD28の発現状態を模式的に示す図。

【書類名】 図面

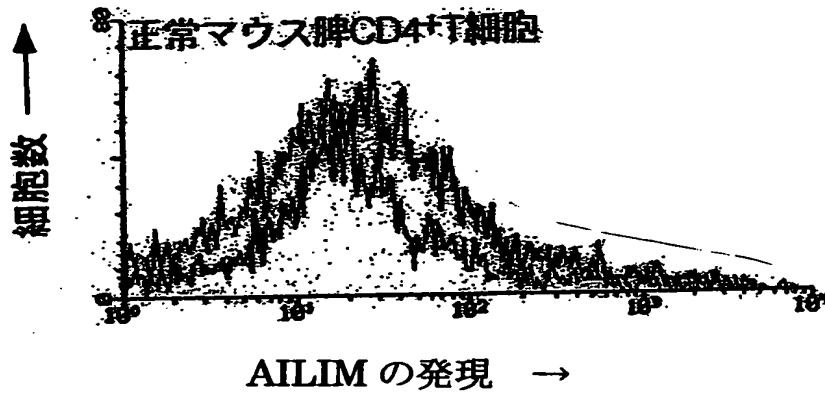
【図 1】



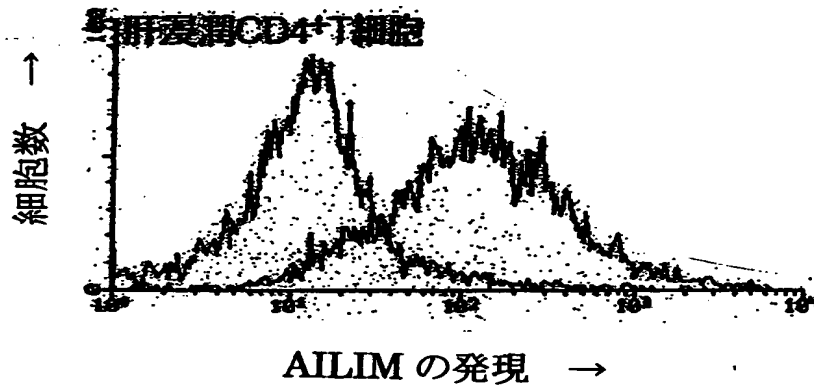
【図 2】



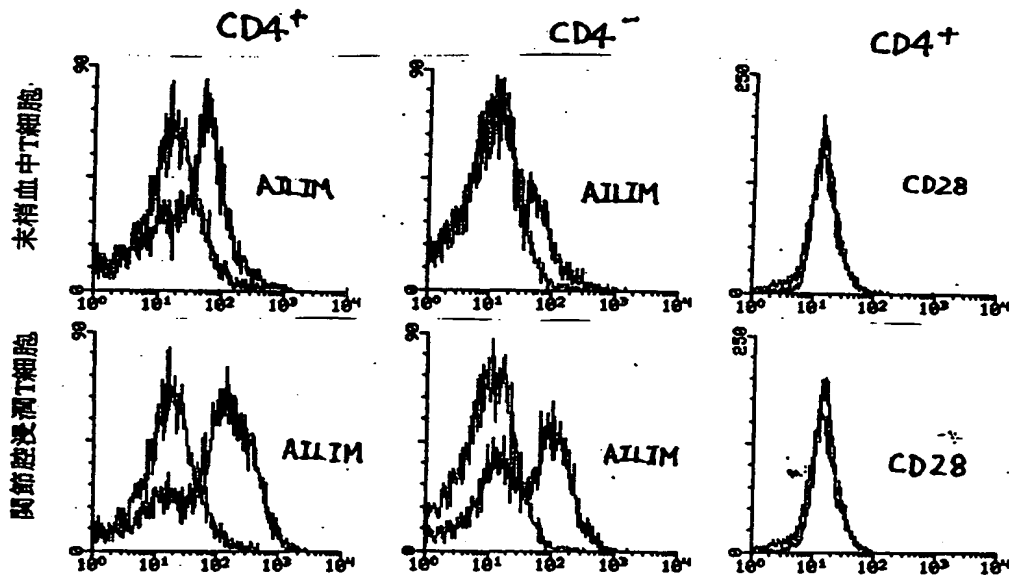
【図3】



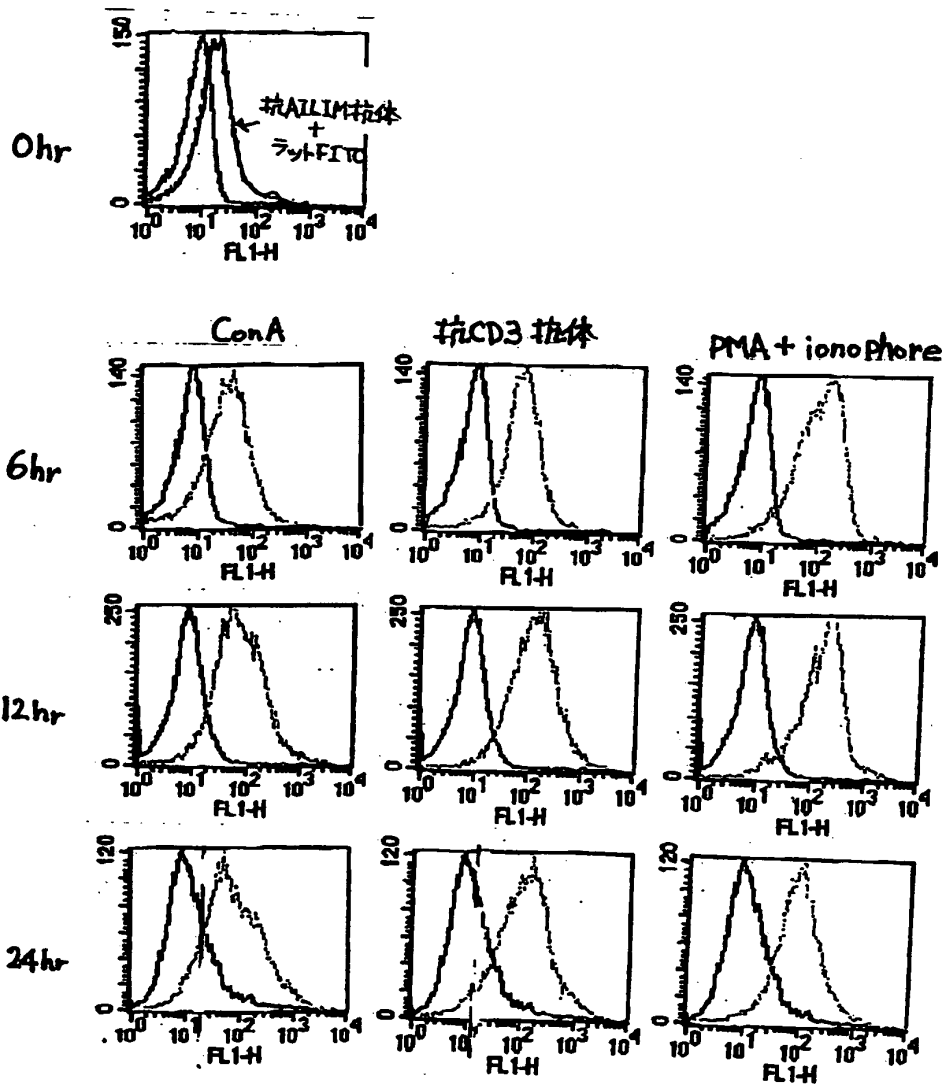
【図4】



【図5】



【図6】

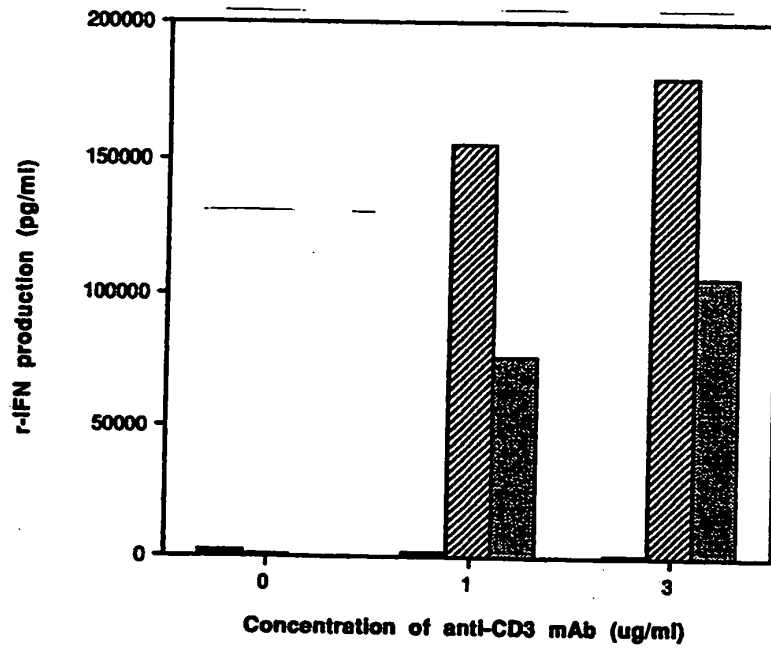


各種 T 細胞株の ALLIM (マウス) の発現パターン

line	specificity	Lymphokine	Th1/Th2	CD28/ALLIM
1. T cell line				
D10	Con-Albumin	IL-4	Th2	+/+
MS202	I-A <sup>b</sup>	IL-4	Th2	+/+
CD28KO	I-E <sup>b</sup>	IL-4	Th2	-/+
EL-4	?	IL-4/-2	Th0	+/+
2L2	Cytochrome C	IL-2/IFN- $\gamma$	Th1	+/-
BC3C13	Mls <sup>b</sup>	IFN- $\gamma$	Th1	+/-
2. T-hybridoma (BW5147-parent)				
KV24	?	IL-2	Th1	+/-
DO.11.10	OVA	IL-2	Th1	+/-
8-4-31	SEB	IL-2	Th1	+/-
3H10-11	SEB	IL-2	Th1	+/-
61-21-25	SEB	IL-2	Th1	+/-
1-2-66	SEB	IL-2	Th1	+/-
6-13-64	SEB	IL-2	Th1	-/-

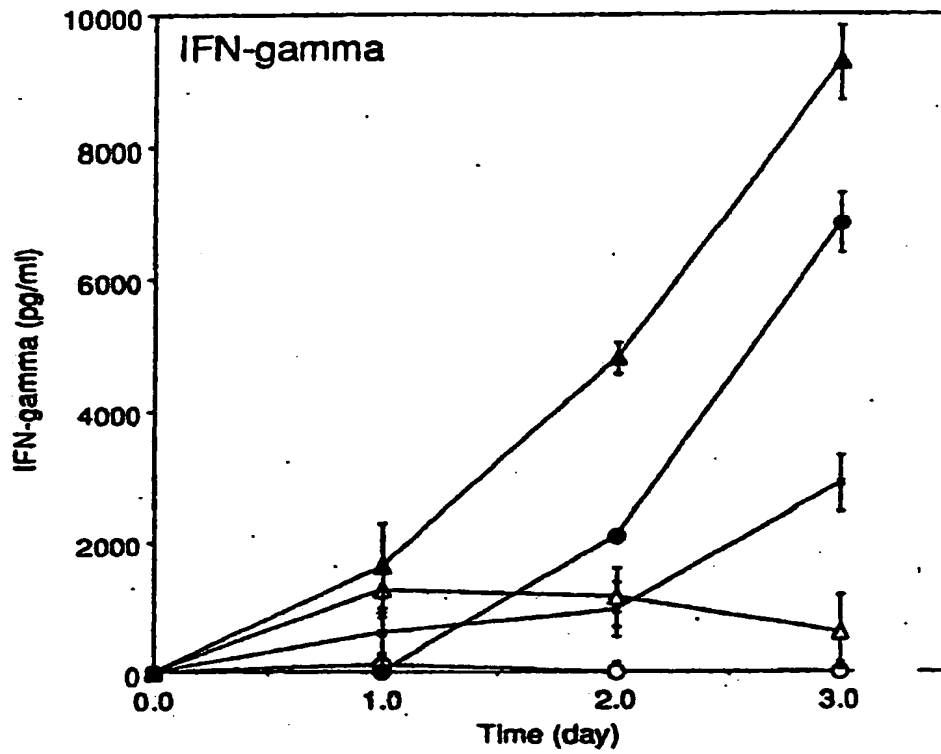
【図 7】

【図 8】



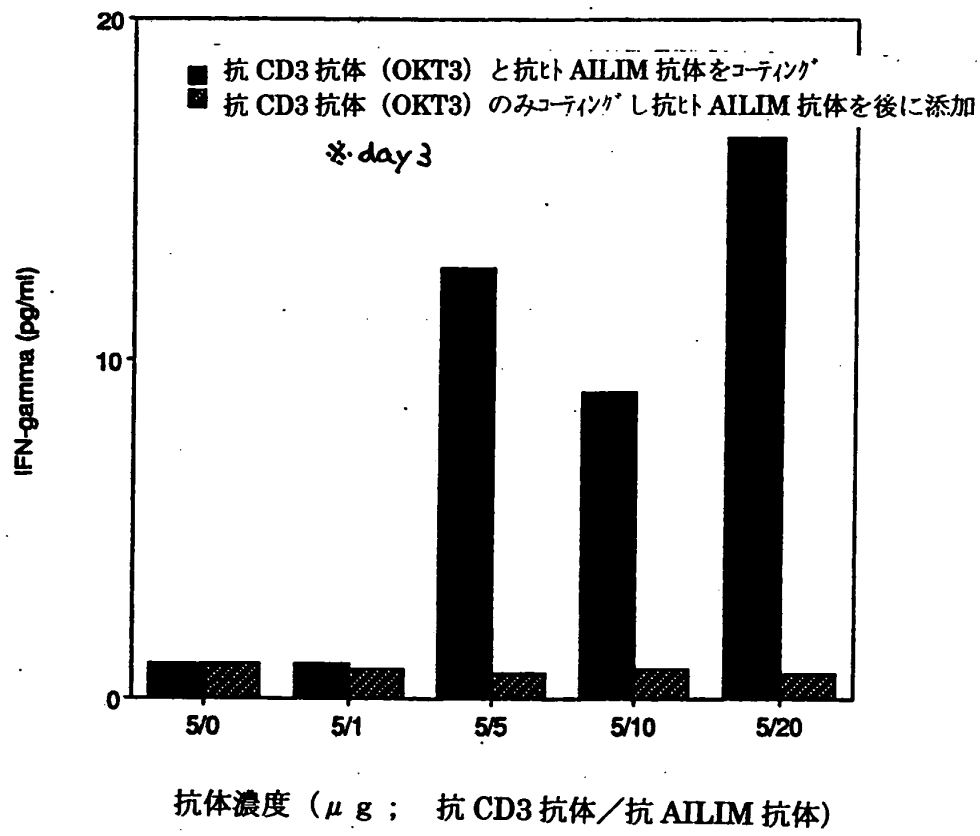
- 抗 CD3 抗体のみコーティング
- ▨ 抗 CD3 抗体 + 抗 CD28 抗体をコーティング (day 3)
- ▩ 抗 CD3 抗体 + 抗マウス AILIM 抗体 (B10.5) をコーティング (day 3)

【図 9】



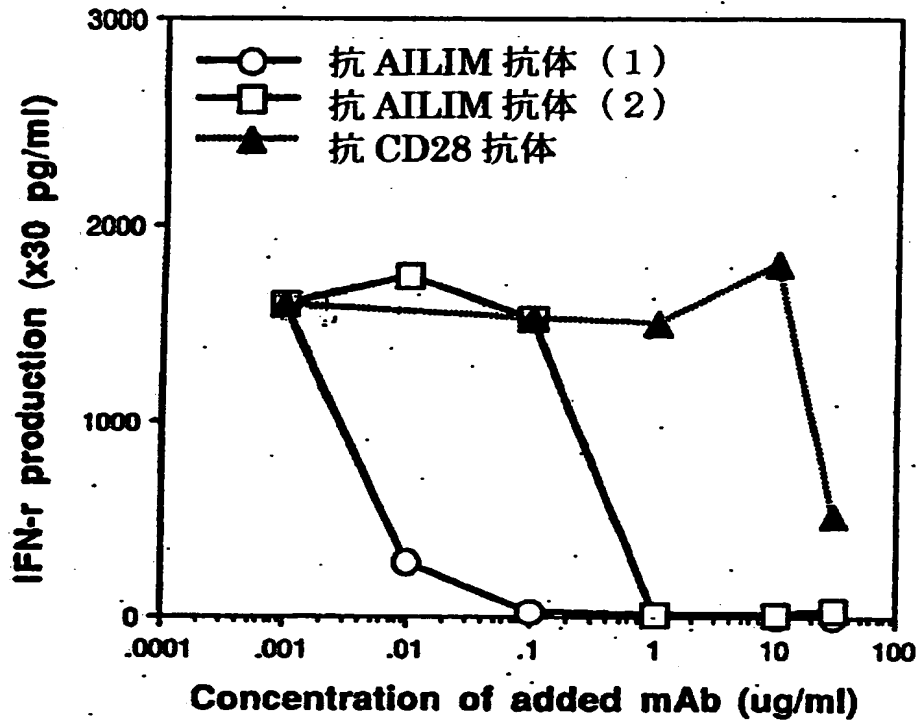
- ▲ 抗 CD3 抗体 + 抗ラット AILIM 抗体 (JTT-1 抗体) をコーティング
- 抗 CD3 抗体 + 抗 CD28 抗体をコーティング
- × 抗 CD3 抗体のみコーティング
- △ 抗ラット AILIM 抗体 (JTT-1 抗体) のみコーティング
- 抗 CD28 抗体のみコーティング

【図 10】

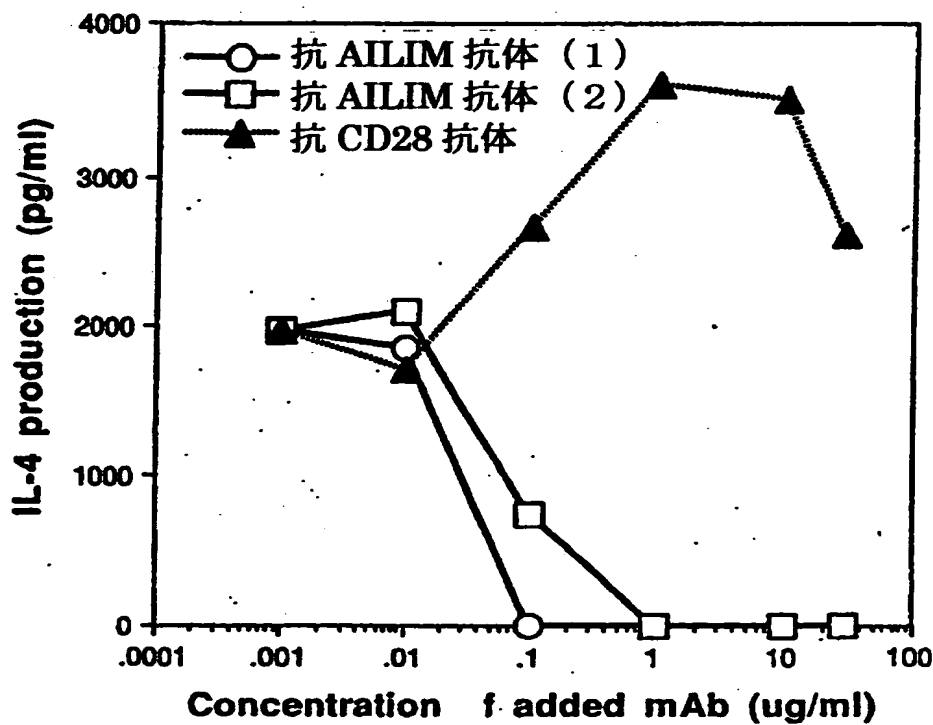




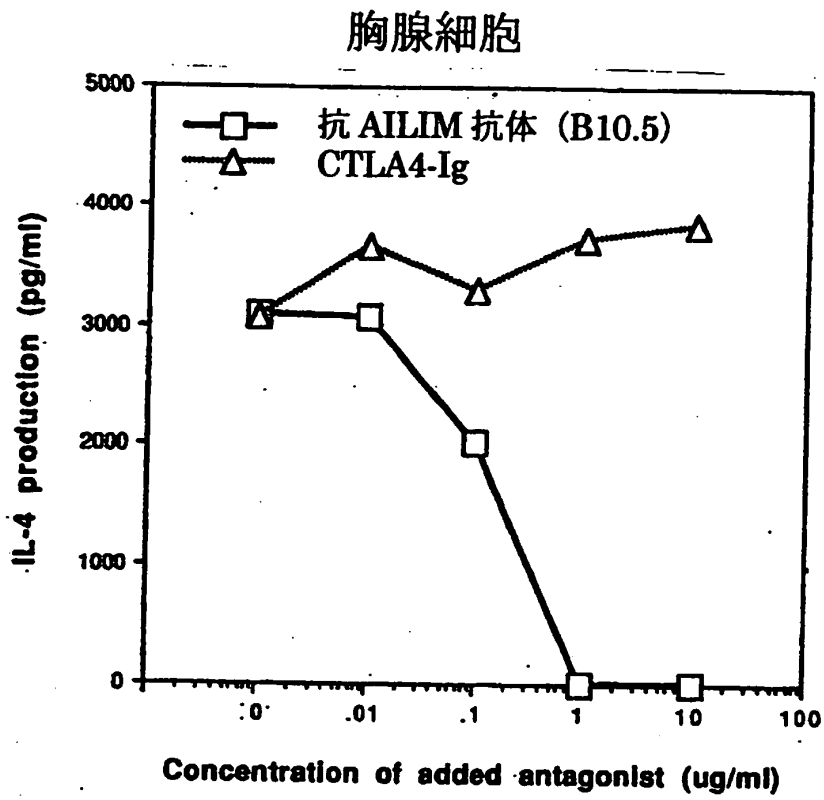
【図 1 1】



【図 1 2】

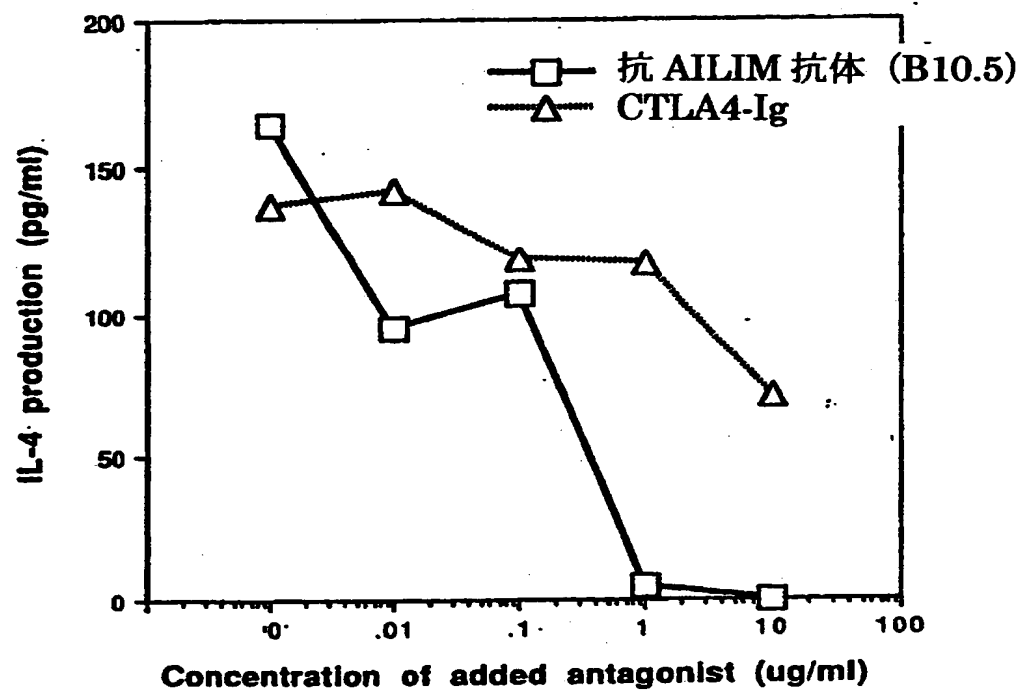


【図 13】

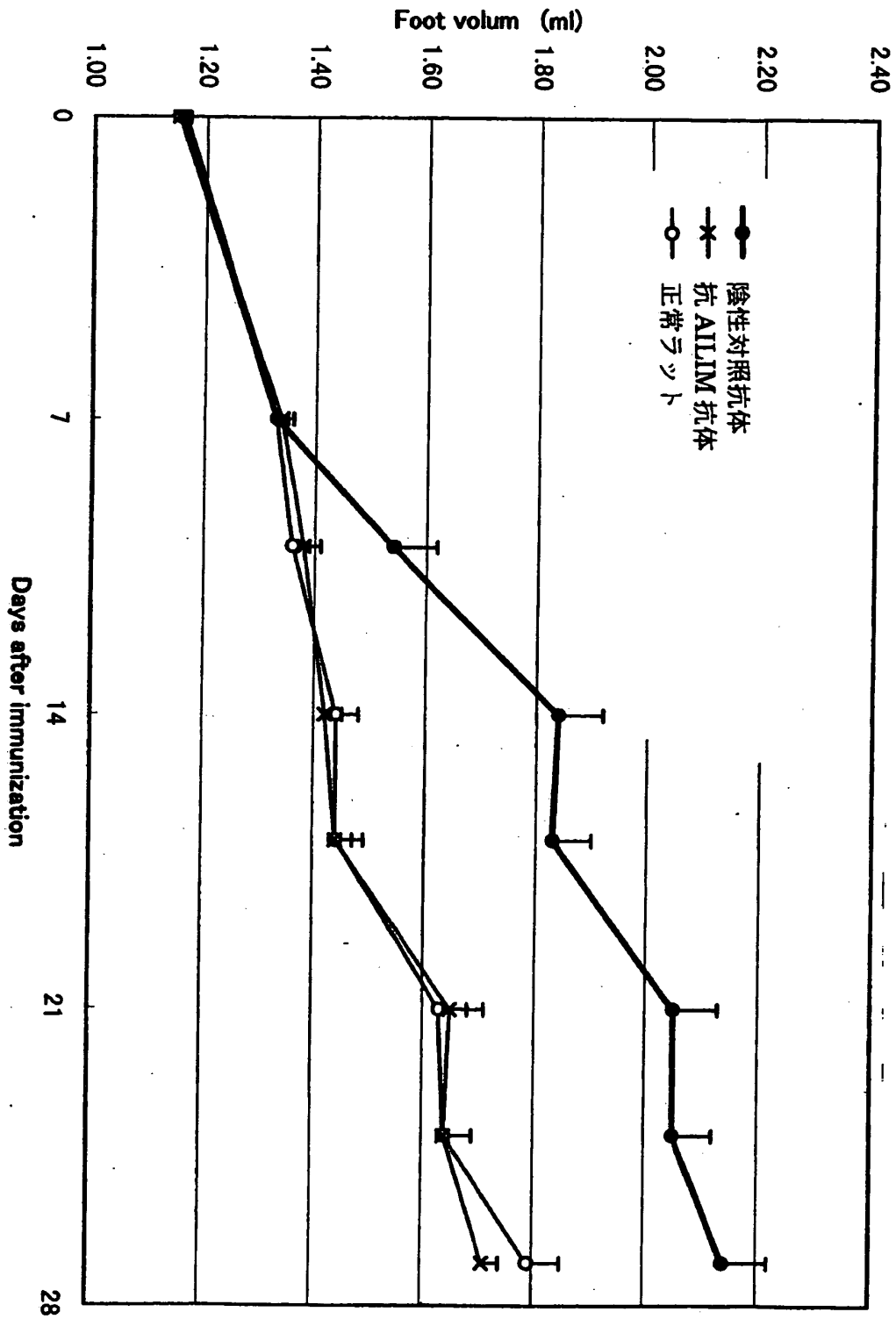


【図 1 4】

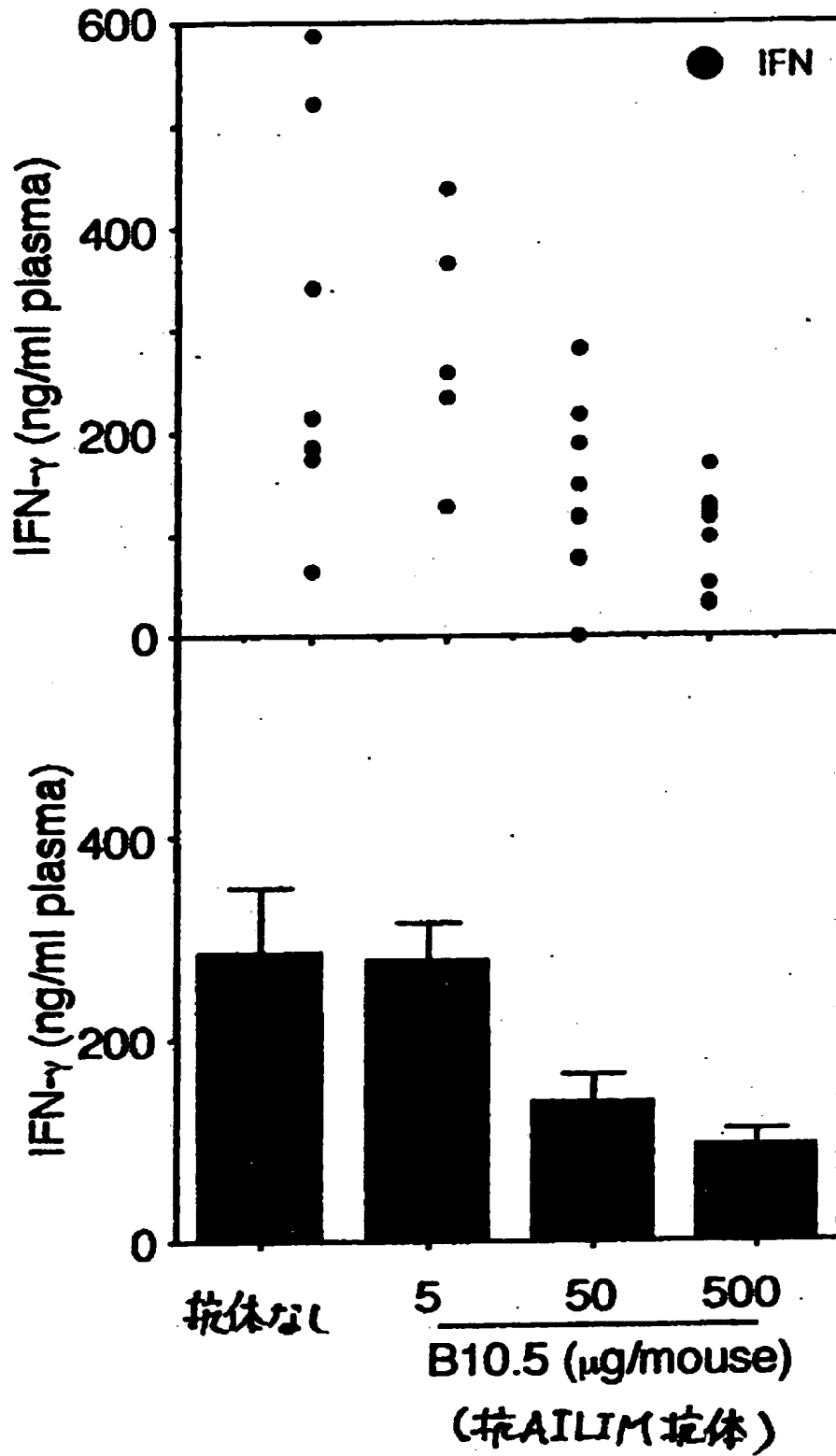
脾臓細胞



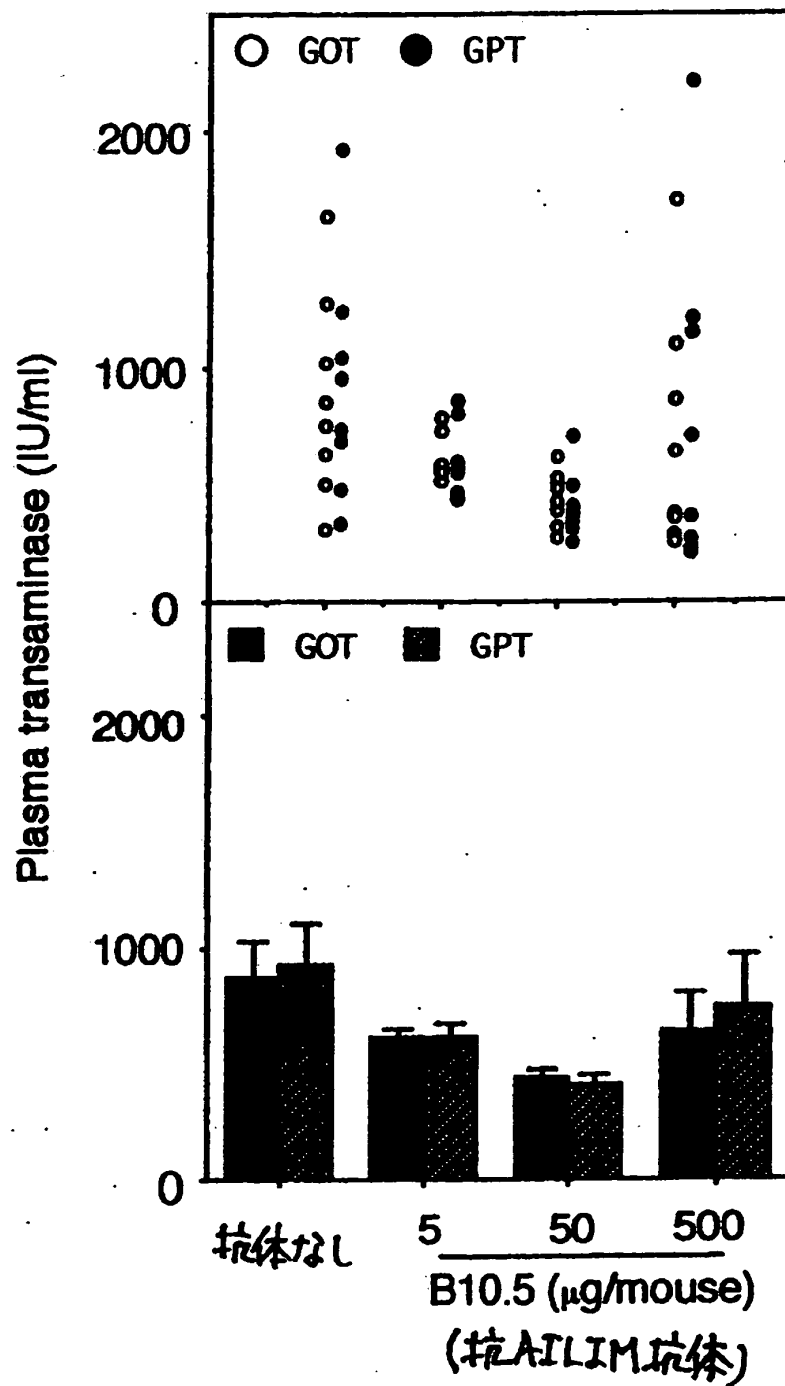
【図 15】



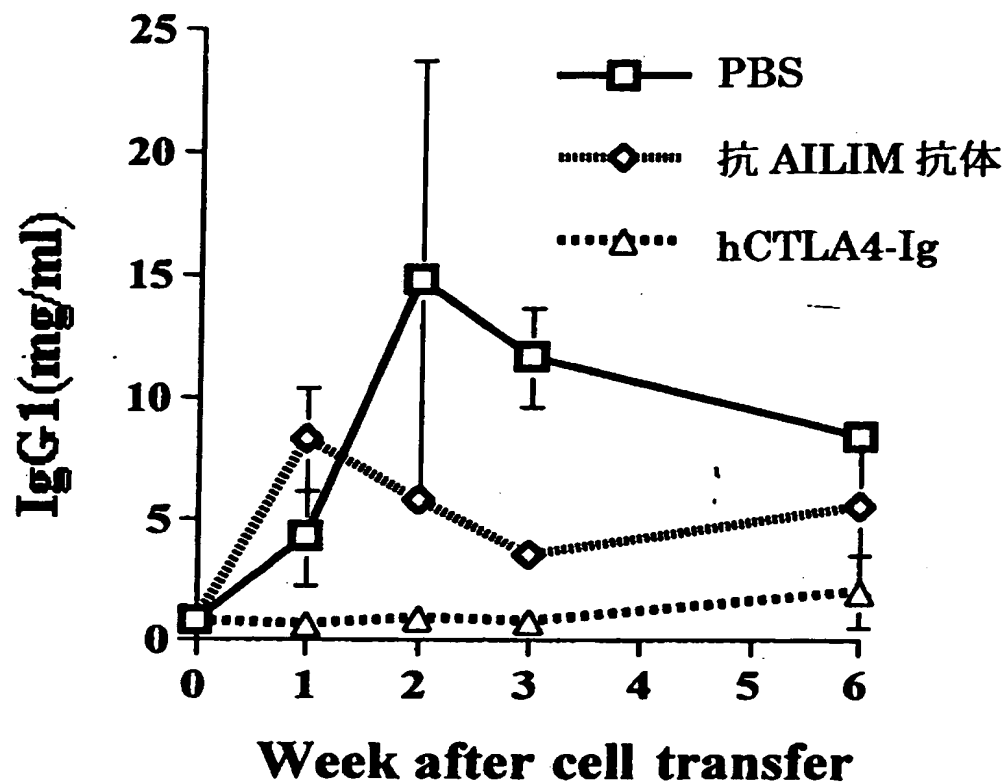
【図16】



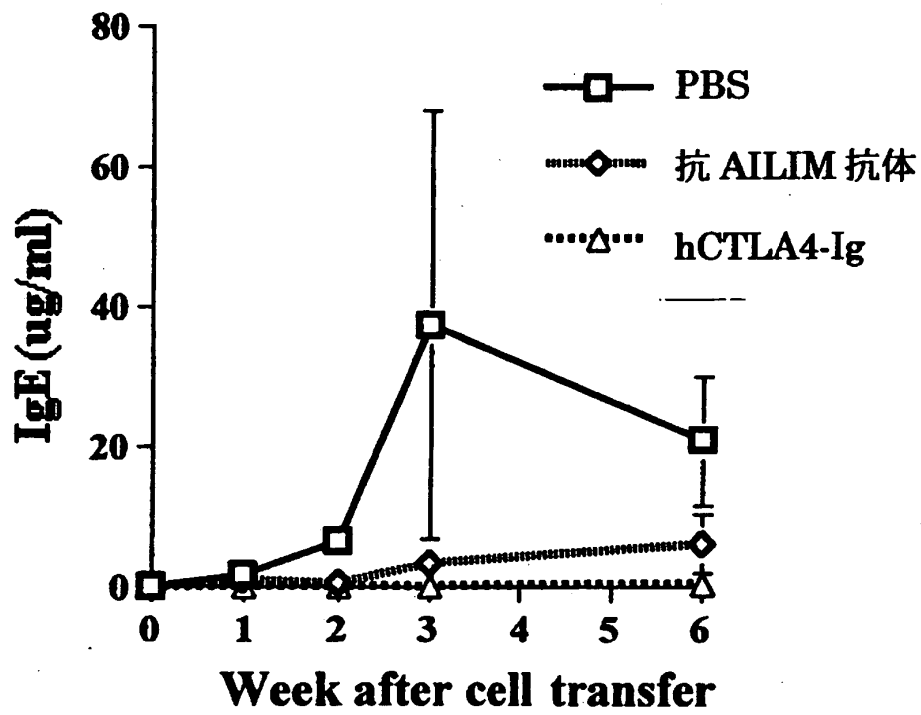
【図 17】



【図 1 8】

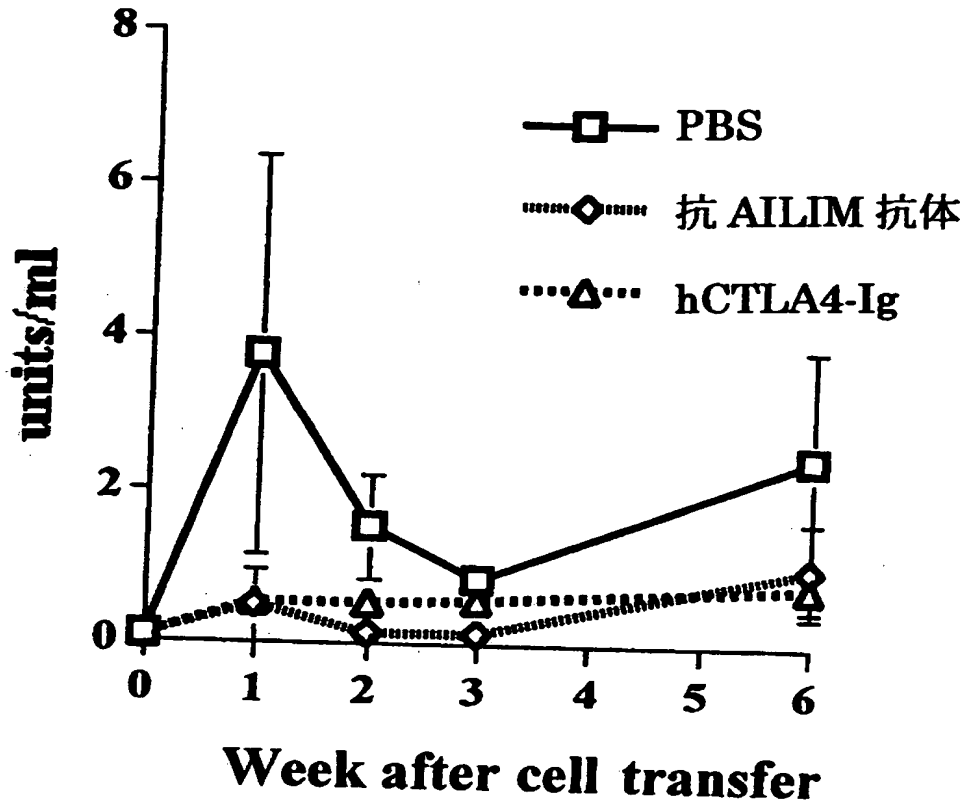


【图 1 9】

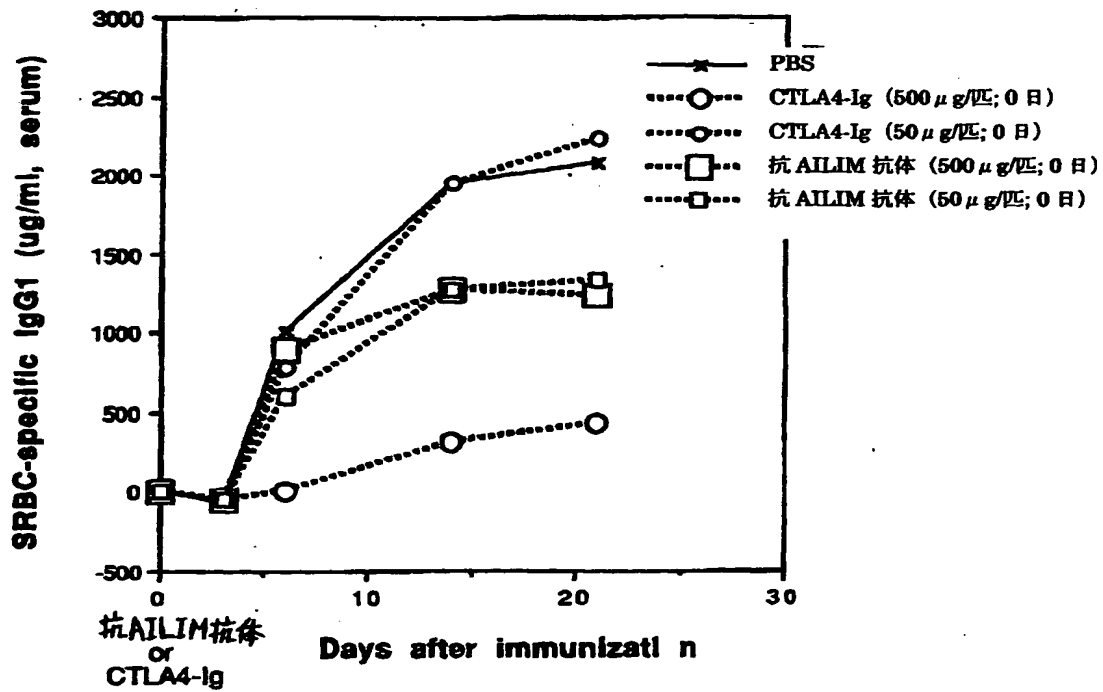




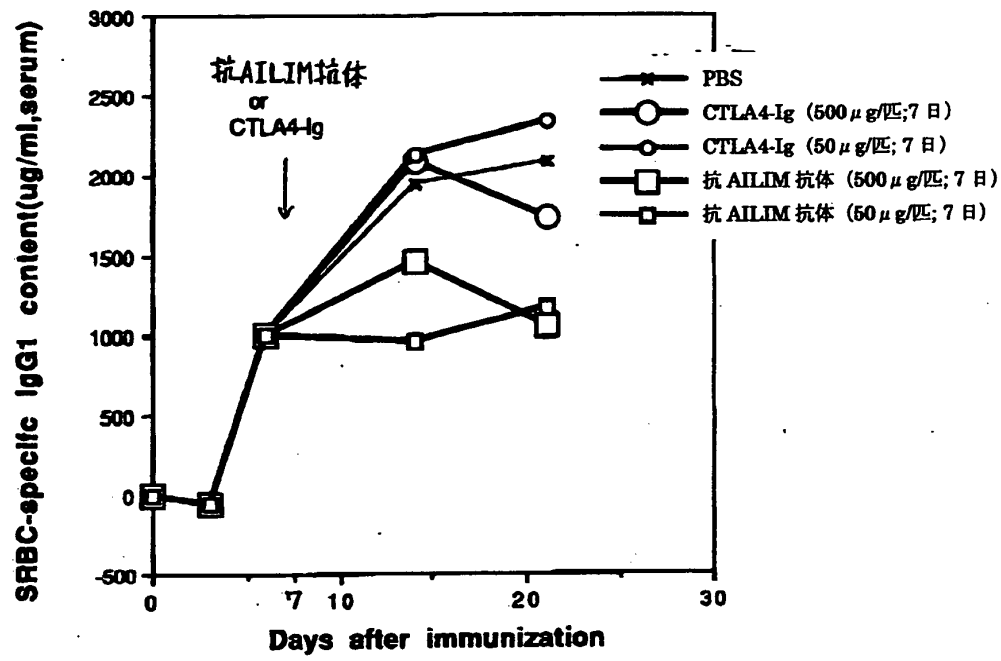
【图 20】



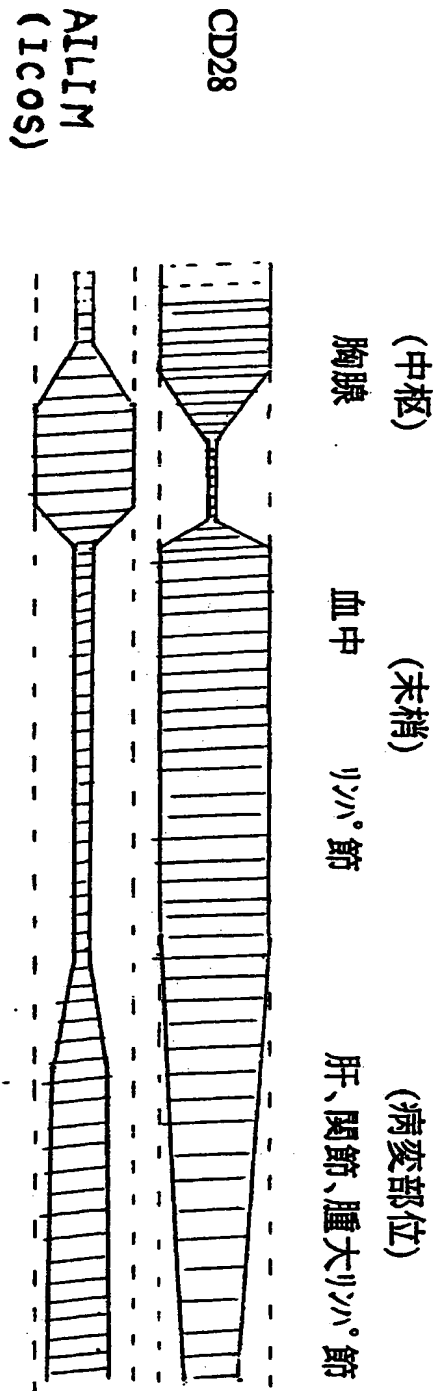
【图 21】



【図 22】



【図 23】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 T細胞等のリンパ球の活性化並びに活性化リンパ球の機能制御の異常に起因する種々の自己免疫性疾患、アレルギー性疾患または炎症性疾患（例えば、関節リウマチや変形性関節症などの関節症、移植片対宿主病、肝炎等の炎症、外来抗原による免疫感作により惹起される該抗原に対する抗体の過剰産生を伴う疾患症状など）を治療または予防するための医薬組成物を提供する。

【解決手段】 AILIM（JTT-1抗原、JTT-2抗原、ICOS及び8F4とも呼ぶ）に対する抗体が、関節リウマチや変形性関節症などの関節症、移植片対宿主病、肝炎等の炎症、外来抗原による免疫感作により惹起される該抗原に対する抗体の過剰産生を伴う疾患症状に対して有意な治療効果を有することを見出した。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第242672号
受付番号	59900835242
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成11年 9月 1日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成11年 8月30日
-------	-------------

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000004569]

1. 変更年月日	1995年 5月16日
[変更理由]	住所変更
住 所	東京都港区虎ノ門二丁目2番1号
氏 名	日本たばこ産業株式会社